



THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Présentée et soutenue par :

David Müller

le vendredi 30 septembre 2016

Titre :

Conséquences traductionnelles de la perte de 4E-BP1
dans l'adénocarcinome pancréatique

École doctorale et discipline ou spécialité :

ED BSB : Cancérologie

Unité de recherche :

Inserm U1037 Centre de Recherche en Cancérologie de Toulouse

Directeur/trice(s) de Thèse :

Dr. Stéphane Pyronnet

Dr. Yvan Martineau

Jury :

Pr. Hervé Prats, Professeur des Universités, Toulouse - Président

Dr. Mario Pende, DR Inserm, Paris - Rapporteur

Dr. Patrick Jacquemin, Maître de recherches, Bruxelles - Rapporteur

Pr. Patrick Cormier, Professeur des Universités, Roscoff - Examinateur

Dr. Stéphane Pyronnet, DR Inserm, Toulouse - Directeur de thèse

Dr. Yvan Martineau, CR Inserm, Toulouse - Directeur de thèse

Remerciements

Je souhaiterais en premier lieu remercier les membres de mon jury de thèse, d'avoir accepté d'évaluer l'ensemble de mon travail, et d'avoir participé à ma soutenance :

Pr. Hervé Prats
Pr. Patrick Cormier
Dr. Mario Pende
Dr. Patrick Jacquemin
Dr. Stéphane Pyronnet
Dr. Yvan Martineau

Ce fut un honneur et un plaisir d'échanger avec vous, dans une discussion aussi constructive. Je vous prie de croire en ma gratitude et en ma grande considération.

Yvan, je te remercie d'avoir été mon mentor depuis mes débuts dans la Science. Tu m'as appris à aimer ce métier, et à ne jamais le considérer comme un « travail ». La dimension technique de ton enseignement ne me fait pas oublier ton éthique et ta vision que tu as tant de fois partagées avec moi. J'espère que tu sauras transmettre à d'autres étudiants ce que j'ai reçu, avec cette passion et cette détermination qui te caractérisent.

Mes chefs d'équipe, Stéphane et Corinne, je tiens à vous remercier pour votre accueil dans cette merveilleuse équipe 6 et pour votre soutien sans faille. Stéphane tu as toujours su apporter optimisme et clairvoyance à mon travail, et tes conseils m'ont de nombreuses fois permis d'adopter une approche différente de mes résultats. Corinne, tu t'es toujours rendue accessible, et tu n'as cessé de me conseiller et m'encourager dans mon projet, mais aussi dans mes perspectives professionnelles.

Ces presque six années passées au laboratoire ont été une véritable promenade de santé grâce au formidable entourage qui a su m'intégrer et rythmer mes journées au labo...

Merci aux anciens thésards, Charline, Romain et Yannick. Charline tu as été ma « maman » des débuts, à la paillasse, à la façon d'appréhender la Science. Tu as été un véritable modèle de persévérance, d'abnégation, en bref de tout ce qui est contraire au renoncement. Ta modestie et ta simplicité continuent de m'inspirer au quotidien, pour mon plus grand bien ! Romain nous avons formé un sacré duo, et je pense avoir été un des seuls à avoir pu contenir ton tempérament de feu. Tu as fait preuve d'une incomparable ténacité pour te faire respecter dans le milieu des scientifiques, et tu y es parvenu avec la manière. J'espère pouvoir relever le challenge du post-doc comme tu le fais actuellement. On aura passé de sacrées années... Yannick tu es vite parti à NYC mais tu m'auras laissé une trace indélébile. Une trace mentale. Je respecte ton assurance et ton obstination, qui me laissent toujours admiratif et envieux.

Cathy et Emeline vous m'avez accepté très tôt dans ce que l'on appelait autrefois le « bureau du bonheur ». C'est probablement vous qui me connaissez le mieux, après avoir vu le meilleur et le pire (surtout Cathy) de moi-même. Vous croirez donc à ma sincérité quand je dis que votre encadrement professionnel et personnel a largement contribué à mon bien-être dans cette équipe. Le labo sans vous, ce n'est pas le labo. Merci à vous.

« Les filles » du labo, Stéph, Chris, Julia, Emilie, Marjorie, vous avez toujours été encourageantes, et parfois même, vous m'avez rassuré. Vous avez accepté tant bien que mal mon humour destructeur qui ne vous a pourtant jamais épargné. Merci pour votre tolérance, c'est bientôt fini... Mon ombre ne planera pas longtemps sur ce labo puisque vous récoltez Sonia, dont les talents humoristiques dépassent l'entendement. Elle saura j'en suis sûr perpétuer cette chaude ambiance de camaraderie si chère à mon cœur. Sonia, fais bon usage de cet héritage que je te lègue.

Rémi, mon compagnon de paillasse, mais aussi de soirée, de sport, et j'en passe, tu as rétabli l'équilibre dans la force. Ta gentillesse exemplaire n'a pas eu raison de mon sens aiguë de la critique mais l'a tout au moins adouci. Je pense sans me tromper que notre amitié a dépassé les frontières du labo et qu'elle se perpétuera pour des siècles et des siècles à venir...

La « team traduction », la complicité que nous avons sera, il est certain, difficile à retrouver ailleurs. Julie, ta bonne humeur au quotidien nous fait vite oublier nos médiocres résultats. Quant à tes rires sincères, ils m'ont toujours donné l'illusion d'être drôle, et je t'en remercie. Manon tu n'as jamais été d'accord avec moi, mais c'est là le socle de notre relation. Dans cette équipe, tu es probablement le seul écho à mon sarcasme, qui t'aura tout de même tant de fois agacé. Côté labo, je dois vous remercier pour votre fiabilité et votre intégrité, qui m'ont permis de me reposer sur vous plus d'une fois.

Célia je te remercie pour ta naïveté, tes histoires de petits chats aux repas, ta tolérance à mon égard, car bien des fois j'aurais pu t'excéder. Ton intérêt pour les autres, ta générosité et ta persévérance seront j'en suis sûr récompensés. Merci pour cette fraîcheur que tu as toujours su apporter dans notre groupe.

J'ai une pensée particulière pour les « anciens » du Master 2, qui m'ont entouré dans cet institut. Théo, tu es sans nul doute le plus brillant d'entre nous. Il fut certes facile de nous perdre avec tes thématiques barbares, mais il paraît que tu es bon dans ce que tu fais...Blague à part, tu m'auras quand même bien aidé, je te dois beaucoup. J'espère te recroiser dans un labo un jour... Guillaume, tu es certainement le plus original d'entre nous. Ta collection de gobelets en plastique et de licornes en peluche illustrent à merveille mon propos. Tu n'as cessé de me régaler au cours de notre parcours. De tes prestations de guitare en amphithéâtre à ta passion des jeux de cartes atypiques, tu es à mes yeux le Didier Super de la Science.

Mes années CRCT ont aussi été rythmées par nos voisins de l'équipe 2, en particulier Laure, Marie-Jeanne, et Marina avec qui j'ai toujours pu alterner conversations scientifiques et blagues douteuses. Quelle bénédiction d'avoir emménagé à côté de vous, quand nous aurions pu tomber sur l'équipe 10 ou l'équipe 5...

Je n'oublie pas les autres voisins et anciens de Rangueil, en particulier Jérôme et Dorian, qui ne se prennent jamais au sérieux. Dorian, merci de m'avoir initié aux joies du foot à 5, j'espère que tu perceras un jour, tu le mérites tellement.

Vous avez suivi mon parcours de « l'extérieur », jusqu'au jour J où vous m'avez apporté tout votre soutien, alors merci à vous. Mes kinés, avec un clin d'œil à mon éternel coloc Coco, et Nico qui m'ont intégré dans ce groupe. Mon Popeye tu t'es minutieusement intéressé à ma progression depuis les débuts et tu m'as toujours valorisé, sois sûr que tu seras mon médecin de famille. A vous trois, vous m'avez offert des années inoubliables, et ce n'est pas fini.

Nous avons vécu presque dix ans séparés, et pourtant notre amitié ne s'en est jamais trouvée altérée. Mathieu, Warren, Nathan, Clarisse, vous êtes mon petit bout de caillou auquel je me suis toujours raccroché. Vous étiez là au départ, et vous m'avez suivi tout du long. Merci pour vos encouragements, pour tous nos rires ensemble et ce qu'il reste à venir...

Vous étiez mon premier soutien, et l'êtes toujours resté, Raymond, Chantal, Marie-Jo. Vous m'avez accueilli sur ce continent lointain, et votre présence toute proche m'a toujours rassuré, notamment pendant mes premiers hivers... Vous m'avez encouragé dans mes choix, et continuerez à le faire, je n'en doute pas.

Les Prezman, les Pietri, parents et grands-parents, votre soutien a été crucial durant ces années d'études. Vous êtes devenus ma deuxième famille et m'avez offert des moments de joie inoubliables. Merci d'avoir été présents en ce jour si important, et surtout de continuer à me soutenir.

Diana, ta présence, pas si loin de moi, m'a toujours rassuré, et nos retrouvailles m'ont remis du baume au cœur nombre de fois, au travers de nos rétrogradations mentales, mais aussi de notre amour commun de la critique musicale. Maintenant c'est ton tour, fais-nous un joli dessin et offre-nous de nouveaux moments inoubliables en famille.

Papa, Maman, Eli, vous avez parcouru la moitié de la planète pour assister à ce jour si important. Rien ne pouvait me combler plus que votre présence. Ce parcours, je vous le dois en grande partie. Vous m'avez toujours fait confiance, et n'avez cessé de me soutenir durant ces (longues) années studieuses. C'est tout naturellement que je vous dédie ce travail, vous qui m'avez fait aimer la Science depuis mon plus jeune âge.

Maud, tu as été depuis les débuts mon modèle et ma principale source d'inspiration, par ton exemplarité dans le travail et ta volonté d'exceller. Si la thèse est belle est bien une épreuve, elle est loin d'être le travail d'une seule personne. De par ta présence à mes côtés et ton soutien inconditionnel, tu as, sans le savoir, grandement œuvré à cette réussite. Sans toi je n'en serais pas là, c'est une certitude.

Résumé

L'adénocarcinome pancréatique est la 4^{ème} cause de décès liés aux cancers dans les pays occidentaux et constitue un véritable défi, tant l'absence de traitement curatif assombrit son pronostic. Les récurrents échecs des thérapies ciblées soulignent la particularité de sa physiopathologie vis-à-vis des autres cancers et la nécessité d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques.

La mutation activatrice de l'oncogène KRAS, considérée comme l'événement initiateur de la carcinogenèse pancréatique, est retrouvée dans plus de 90% des cas. En aval, l'activation des voies de signalisation MAPK et PI3K entretient l'oncogenèse et constitue un trait caractéristique du cancer pancréatique. Au carrefour de ces voies se situe la synthèse protéique, dont l'altération, si elle est retrouvée dans de nombreux cancers, semble jouer un rôle encore plus déterminant dans le cancer du pancréas. L'adénocarcinome pancréatique est en effet caractérisé par une perte d'expression du répresseur traductionnel 4E-BP1, dès les stades précoces de la transformation, qui n'est observée dans aucun autre cancer. La perte de ce régulateur suggère que la traduction est augmentée et facilite le déroulement de nombreux processus cellulaires indispensables au développement tumoral.

Mes résultats démontrent que l'absence de 4E-BP1 confère un avantage prolifératif aux cellules cancéreuses pancréatiques exprimant KRAS muté, en favorisant leur réplication. Cette faculté est acquise au travers d'une perte de régulation de la synthèse d'effecteurs décisifs pour l'entrée en phase S et l'initiation de la réplication. Ces mécanismes sont transposables *in vivo*, puisque l'absence de 4E-BP1 favorise la régénération tissulaire suite à une pancréatite en facilitant la prolifération cellulaire. Ces observations suggèrent que la perte de 4E-BP1 pourrait constituer un mécanisme de résistance à la chimiothérapie en favorisant la réplication des cellules cancéreuses. L'utilisation d'inhibiteurs de la traduction pourrait ainsi constituer une nouvelle approche thérapeutique, en bloquant la réplication et en potentialisant l'effet de la chimiothérapie.

SOMMAIRE

Résumé	1
SOMMAIRE	3
Liste des figures	7
Tableaux	8
Liste des abréviations	9
INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	11
CHAPITRE 1 : BIOLOGIE ET PATHOLOGIES DU PANCREAS	13
A. Physiologie et développement du pancréas sain	14
1. Anatomie du pancréas	14
2. Embryologie, différenciation et facteurs de transcription	15
2.1. Des cellules progénitrices aux bourgeons pancréatiques	15
2.2. La spécification des domaines Tip et Trunk	15
3. Physiologie générale du pancréas	18
3.1. Composition du pancréas endocrine	18
3.2. Physiologie du pancréas exocrine	18
B. Pathologies du pancréas exocrine	20
1. La pancréatite	20
1.1. La pancréatite aiguë	20
1.2. La pancréatite chronique	21
1.3. La pancréatite induite par la céruléine	22
1.4. La métaplasie acino-canalaire	25
2. Les tumeurs malignes du pancréas exocrine	27
C. L'adénocarcinome pancréatique	27
1. Etiologie	28
1.1. Facteurs environnementaux	28
1.2. Facteurs génétiques	29

2. Traitements de l'adénocarcinome pancréatique	30
2.1. Tumeur opérable	30
2.2. Stade métastatique	31
1. Anatomie pathologique	31
3.1. Les lésions préneoplasiques	31
3.2. Origine cellulaire	33

CHAPITRE 2 : BASES MOLECULAIRES DE LA CARCINOGENESE PANCREATIQUE

A. Génomique descriptive et fonctionnelle de l'adénocarcinome pancréatique.....	36
1. Les grandes études génomiques	36
1.1. Mutations « drivers » et hétérogénéité tumorale.....	36
1.2. Les études de stratification : les sous-types d'ADK	38
2. Les cribles génétiques chez la souris ou approches « forward »	43
2.1. Le système Sleeping Beauty	44
2.2. Le système piggyBac	45
2.3. Utilisation du système CRISPR/Cas9 et modèle sporadique.....	45
B. Modèles murins et génomique fonctionnelle de l'ADK.....	47
1. Modéliser l'ADK chez la souris	47
1.1 Les modèles conditionnels	47
1.2. Les modèles inductibles	50
2. Modèles murins et recherche de cibles thérapeutiques.....	52
2.1. En amont et en aval de KRAS	52
2.2. Microenvironnement : inflammation et immunosuppression	56
C. Les thérapies ciblées dans le traitement de l'ADK.....	59
1. Ciblage de la cellule cancéreuse	59
2. Ciblage du stroma	60
3. Immunothérapie.....	61

CHAPITRE 3 : LA TRADUCTION ET SON IMPLICATION EN CANCEROLOGIE.....	63
A. Vue d'ensemble de la traduction chez les eucaryotes supérieurs.....	64
1. L'initiation de la traduction comme étape critique.....	64
1.1. eIF4F et le recrutement du ribosome	64
1.2. De l'élongation à la réinitiation	65
2. Régulation de la traduction par mTOR.....	67
2.1. Les S6Ks	68
2.2. Les 4E-BPs.....	69
B. Contribution de la traduction au développement des cancers	72
1. Altérations des facteurs de la traduction dans les cancers.....	73
1.1. La voie PI3K et les 4E-BPs	73
1.2. La voie des MAPK et la phosphorylation d'eIF4E.....	74
2. La traduction sélective et le traductome des cancers.....	76
2.1. L'analyse du traductome.....	76
2.2. Dépendance à eIF4E et motifs en 5'UTR	78
2.3. Régulation par mTOR et séquences régulatrices	79
2.4. Régulation par eIF4A.....	80
C. Ciblage de la traduction en cancérologie.....	83
1. Ciblage des régulateurs d'eIF4F	83
1.1. Les inhibiteurs de la voie PI3K/mTOR	83
1.2. Les inhibiteurs de MAPK	85
2. Les inhibiteurs du complexe d'initiation	85
2.1. Inhibition d'eIF4E.....	85
2.2. Ciblage de l'interaction eIF4E-eIF4G.....	86
2.3. Les inhibiteurs d'hélicase	87

RESULTATS EXPERIMENTAUX	89
Introduction aux résultats expérimentaux	91
La perte d'expression de 4E-BP1 dans les tumeurs pancréatiques permet un échappement au contrôle traductionnel.....	93
Les 4E-BPs perturbent la phosphorylation d'eIF4E	109
La perte du contrôle traductionnel exercé par 4E-BP1 favorise la réplication de l'ADN dans le cancer du pancréas	117
Discussion générale.....	147
Perspectives	153
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	157
ANNEXES	175

Liste des figures

Figure 1 : Anatomie et histologie du pancréas

Figure 2 : Différenciation cellulaire et organogenèse du pancréas

Figure 3 : La cellule acineuse et la synthèse des enzymes digestives

Figure 4 : Mécanismes et caractéristiques histologiques de la pancréatite

Figure 5 : La pancréatite induite par la céruléine

Figure 6 : Schéma simplifié de la prise en charge de l'ADK

Figure 7 : Origines cellulaires et lésions précancéreuses

Figure 8 : Les 12 voies moléculaires altérées dans l'ADK d'après Jones et al.

Figure 9 : Classification des ADK d'après Waddell et al.

Figure 10 : Voies moléculaires altérées et classification des ADK d'après Bailey et al.

Figure 11 : Les différentes classifications des ADK

Figure 12 : Les systèmes de transposition *Sleeping Beauty* et *piggyBac*

Figure 13 : Principaux modèles murins conditionnels d'ADK

Figure 14 : Principaux modèles murins inductibles d'ADK

Figure 15 : Principales cibles thérapeutiques en amont et en aval de KRAS muté au sein de la cellule cancéreuse

Figure 16 : Principales cibles thérapeutiques intervenant dans le remodelage du stroma tumoral

Figure 17 : L'initiation de la traduction cap-dépendante

Figure 18 : Régulation de la traduction par mTOR

Figure 19 : La phosphorylation d'eIF4E et la voie des MAPK

Figure 20 : Les méthodes d'analyse du traductome

Figure 21 : Structures et séquences régulatrices en 5'UTR

Figure 22 : Ciblage de la traduction en cancérologie

Figure 23 : Effets de dérivés du silvestrol sur les cellules cancéreuses pancréatiques

Tableaux

Tableau 1 : Récents essais cliniques de thérapie ciblée déployés pour le traitement de l'ADK

Tableau 2 : Facteurs d'initiation de la traduction altérés dans les cancers

Liste des abréviations

4E-BP : eIF4E-binding protein	Eμ-Myc : B lineage-restricted c-Myc
4EGI-1 : eIF4E/eIF4G interaction inhibitor	FGF : fibroblast growth factor
4ERCat : eIF4E/eIF4G interaction inhibitor	FKBP12 : FK506/rapamycin binding protein
5'TOP : 5'track of oligopyrimidines	Flp : flippase
ADEX : aberrantly differentiated endocrine exocrine	FOLFIRINOX : acide folinique, irinotecan, oxaliplatine, leucovirine
ADK : adénocarcinome pancréatique	FOXP : forkhead box protein
ANOTA : analysis of translational activity	FRT : flippase recognition target
ASO : antisens oligonucléotides	GAP : GTPase activating protein
AXL : récepteur tyrosine kinase	HCV : hepatitis C virus
BRCA : breast cancer gene	HER2 : human epidermal growth factor receptor
CAF : cancer associated fibroblast	hnRNP : heterogenous nuclear ribonucleoprotein
CAR-T : chimeric antigen receptor T-cell	ICGC : international cancer genome consortium
Cas9 : CRISPR-associated protein 9	iKras : inducible Kras
CDKN2A : cyclin-dependent kinase inhibitor 2A	IL : interleukine
CERT : cytosine-enriched regulator of translation	IMPACT : individualized molecular pancreatic cancer therapy
CFTR : cystic fibrosis transmembrane conductance regulator	IRES : internal ribosome entry site
CK19 : cytokeratin 19	JAK : janus kinase
CMN : cystic mucinous neoplasms	KC : <i>Pdx1-Cre ; lsl-Kras^{G12D/+}</i>
CRISPR : clustered regularly interspaced short palindromic repeats	KLF4 : Kruppel-like factor 4
CRP : c-reactive protein	KPC : <i>Pdx1-Cre ; lsl-Kras^{G12D/+} ; Trp53^{R172H/+}</i>
CTRC : chymotrypsin C	KRAS : Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
DKO : 4E-BP1/2 double knock out	LKB1 : liver kinase B1
ECOG : eastern cooperative oncology group	LoxP : locus of crossing-over
eEF : eukaryotic elongation factor	MAPK : mitogen-activated protein kinase
EGFR : epidermal growth factor receptor	
eIF : eukaryotic initiation factor	

ERK : extracellular-regulated kinase	Rag : Ras-related GTPase
Mcl-1 : myeloid leukemia cell differentiation protein	Raptor : regulatory associated protein of mTOR
MDSC : myeloid-derived suppressor cell	Rheb : Ras homolog enriched in brain
MEF : mouse embryonic fibroblasts	RPF : ribosome-protected fragments
MEK : mitogen-activated protein kinase	RSK : ribosomal p90 S6 kinase
MMP : matrix-metalloproteinase	RTK : recepteur tyrosine kinase
MNK : MAPK-interacting kinase	S6K : ribosomal p70 S6 kinase
mTOR : mammalian target of rapamycin	SGK : serum and glucocorticoid inducible protein kinase
Nab-paclitaxel : nanoparticle albumin-bound paclitaxel	sgRNA : single guide RNA
nanoCAGE : cap analysis of gene expression	SHH : Sonic Hedgehog
NF-Y : nuclear transcription factor Y	α-SMA : smooth muscle actin α
NF-κB : nuclear factor kappa-B	SMAD4 : S-mother against decapentaplegic homolog 4
NHEJ : non-homologous end-joining	SMO : smoothened
NMF : non-negative matrix factorization	SNP : single nucleotide polymorphism
Nr5a2 : nuclear receptor 5a2	Sox9 : Sry box transcription factor
PABP : polyA-binding protein	SPINK : serine protease inhibitor Kazal
Paip : PABP-interacting protein	STAT : signal transducer/activator of transcription
PanIN : pancreatic intraepithelial neoplasia	TAM : tumor-associated macrophase
PDCD4 : programmed cell death protein 4	TC : ternary complex
PDEδ : cGMP phosphodiesterase	TGF-β : tumor growth factor β
PDGF : platelet-derived growth factor	TIPMP : tumeur intrapapillaire mucineuse pancréatique
PDX : patient-derived xenograft	TNF-α : tumor necrosis factor α
Pdx1 : pancreatic duodenal homeobox	TSC : tuberous sclerosis complex
PEGPH : recombinant human hyaluronidase	USP9X : ubiquitin-specific peptidase 9
PI3K : phosphoinositide 3-kinase	UTR : untranslated region
PIC : pre-initiation complex	VDR : vitamin D receptor
PRSS1 : human cationic trypsinogen gene	VEGF : vascular endothelial growth factor
PTEN : phosphatase and tensin homolog	WNT : wingless-type protein
Ptfla : pancreas transcription factor 1a	
RAF : rapidly activated fibrosarcoma	

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE 1 : BIOLOGIE ET PATHOLOGIES DU PANCREAS

Alors que la première description du pancréas par Hérophile remonte à l'antiquité, il faut attendre le XVII^{ème} siècle et les travaux de Wirsung, De Graaf et Brunner pour avoir un aperçu des fonctions sécrétoires du pancréas. La première description d'un adénocarcinome pancréatique remonte quant à elle aux années 1760, quand Morgagni évoque un « gros pancréas, parsemé de tubercules, avec une dureté comparable à du cartilage ». En 1889, Minkowski parvient à établir une corrélation entre le diabète et le pancréas. Ce n'est qu'au XIX^{ème} siècle que Claude Bernard révèle le rôle primordial du pancréas dans la digestion (1849-1856). Treize années plus tard, Paul Langerhans, encore étudiant, décrit pour la première fois les îlots qui porteront son nom (Busnardo et al. 1983).

Malgré une connaissance grandissante et très approfondie de la biologie et de la physiopathologie pancréatique, le succès des approches thérapeutiques demeure mitigé. Ceci est particulièrement vrai pour les maladies inflammatoires et tumorales du compartiment exocrine, dont les traitements ne démontrent que peu d'effets curatifs sur le long terme. Pour preuve, l'adénocarcinome pancréatique est le seul cancer dont la survie n'a pas progressé au cours des quarante dernières années (d'après l'American Cancer Society). Dans ce contexte, l'exemple de la chimiothérapie et de ses faibles bénéfices soulève la nécessité d'une thérapie plus adaptée. Le pancréas étant un organe très complexe, l'étude des voies moléculaires régissant son développement et son fonctionnement paraît nécessaire à la compréhension de ses multiples pathologies et à l'élaboration de traitements ciblés.

Ce chapitre traitera dans un premier temps du pancréas sain, avec une attention particulière sur son développement, dont l'étude apporte de nombreux éléments de compréhension quant à la physiopathologie du cancer pancréatique. Par la suite, les atteintes du compartiment exocrine seront abordées, avec une large part faite à l'adénocarcinome pancréatique, qui se situe au centre de mes travaux de thèse.

A. Physiologie et développement du pancréas sain

1. Anatomie du pancréas

Le pancréas est un organe mesurant entre 12 et 20 cm, et pouvant peser jusqu'à 110g chez l'homme adulte. Il se situe profondément dans la cavité abdominale, ce qui rend son exploration particulièrement difficile.

La tête du pancréas est située sous le foie, elle est bordée par le duodénum et se voit traversée par le canal cholédoque qui achemine la bile vers le bol alimentaire. L'isthme est la partie la plus étroite et se situe en avant des vaisseaux de l'intestin (artère et veine mésentériques supérieures). Le corps du pancréas s'étend obliquement vers le haut de l'abdomen, en avant du rein gauche. Enfin, la queue est accolée à la rate et à ses vaisseaux (artère et veine spléniques). Dans toute sa longueur, le pancréas est traversé par le canal de Wirsung, dont la fonction est la collecte et l'acheminement vers le duodénum des sucs digestifs pancréatiques. Le canal excréteur accessoire, ou canal de Santorini, parcourt la tête et s'abouche dans le duodénum par la petite caroncule (<http://chirurgie-digestive-sat.aphp.fr>)(figure 1).

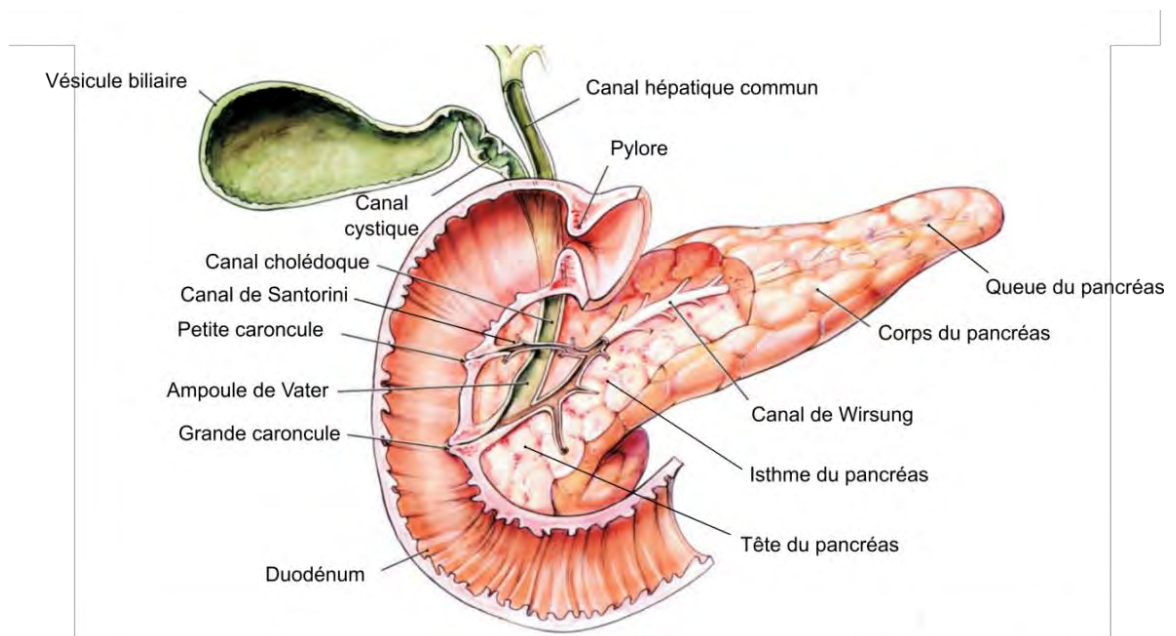


Figure 1 : Anatomie structurelle du pancréas

2. Embryologie, différenciation et facteurs de transcription

Les études s'intéressant à l'organogenèse du pancréas humain demeurent majoritairement descriptives. Néanmoins, le développement d'outils génétiques, en particulier de modèles murins transgéniques, a grandement contribué à définir les facteurs et voies moléculaires régissant le développement de cet organe. Il est désormais admis que le pancréas connaît un développement très similaire chez la souris et l'homme, tout au moins durant les phases précoces.

2.1. Des cellules progénitrices aux bourgeons pancréatiques

Chez la souris, avant même l'émergence des bourgeons pancréatiques, l'endoderme présomptif du pancréas présente une signature moléculaire particulière dès 8,5 jours de développement embryonnaire (E8.5). L'expression du facteur sécrété Sonic Hedgehog (SHH) est spécifiquement réprimée au niveau de ce territoire grâce à l'action de la notochorde, permettant ainsi l'expression du gène homéotique *Pdx1* dans les cellules progénitrices pancréatiques, essentiel à la spécification (Apelqvist, Ahlgren, and Edlund 1997; Jonsson et al. 1994; Offield et al. 1996). Cette restriction spatiale de *Pdx1* semble par ailleurs être favorisée par *Hnf6*, puisque les souris *Hnf6*^{-/-} présentent une expression retardée de *Pdx1* (Jacquemin, Lemaigre, and Rousseau 2003).

A partir de E8.75, les bourgeons pancréatiques dorsaux et ventraux émergent du duodénum, respectivement sous l'influence de l'endothélium de l'aorte dorsale et des veines vitellines (Lammert, Cleaver, and Melton 2001). Ces régions sont caractérisées notamment par l'expression des facteurs de transcription *Pdx1*, *Ptf1a* et *Sox9* (Kawaguchi et al. 2002; Seymour et al. 2007)(**figure 2**). L'expression de ces facteurs de transcription est régulée en partie au sein de l'épithélium via la voie Notch, mais aussi par le mésenchyme environnant, en particulier grâce aux FGF. Au niveau de l'épithélium, la voie Notch régule l'expression de *Hes1* et *Sox9*, alors que le FGF10 exprimé dans le mésenchyme assure le maintien de l'expression de *Ptf1a* (Jacquemin et al. 2006; Shih et al. 2012).

2.2. La spécification des domaines Tip et Trunk

Après s'être développés en parallèle, les bourgeons pancréatiques fusionnent à E12.5 suite à une rotation du duodénum. Une croissance rapide et des changements structuraux de l'épithélium verront alors apparaître des protrusions émanant de ces mêmes bourgeons (Zhou et al. 2007).

Ces structures ramifiées sont caractérisées par l'expression de *Ptf1a*, *c-Myc*, *Cpa*, au niveau des extrémités (domaines « tip ») et au niveau interne (domaines « trunk ») par l'expression de *Nkx6.1/6.2*, *Sox9*, *Tcf2*, *Onecut-1 (Hnf6)*, *Prox1*, *Hes1*. Ces changements morphologiques signent l'amorçage de la différenciation cellulaire. Les expériences de lignage cellulaire révèlent ainsi que les cellules « trunk » engendrent majoritairement les lignées endocrine et canalaire, alors que les cellules « tip » sont rapidement retreintes à la lignée acineuse (Kopinke et al. 2011; Kopp et al. 2011; Wang et al. 2005). Il semblerait que cette spécification entre « tip » et « trunk » soit respectivement gouvernée par les facteurs de transcription PTF1A et NKX6.1/6.2, qui initient une co-répression transcriptionnelle dans chacun des lignages (Schaffer et al. 2010). Des études ont par ailleurs démontré le rôle primordial de la voie Notch dans l'acquisition de l'identité « trunk », notamment par une activation de l'expression de *Nkx6.1* (Murtaugh et al. 2003).

Aux alentours d'E15.5, la majorité des cellules « tip » ont subi une différenciation vers un phénotype acineux. L'activation des gènes caractéristiques de ce type cellulaire (enzymes digestives et protéines de l'exocytose) est permise par la coopération entre les facteurs de transcription NR5A2, MIST-1, et le complexe PTF1-L. Alors que les facteurs MIST-1 et PTF1-L ont un effet négatif sur l'expansion des cellules acineuses, il semblerait que NR5A2 soit à l'origine de l'importante prolifération observée dans ce compartiment jusqu'à la naissance (Benod et al. 2011; Jia, Sun, and Konieczny 2008; Rodolosse et al. 2004).

Si les cellules « tip » ont un destin unique, les domaines « trunk » donnent à la fois naissance aux cellules canalaire et endocrines. Lors de la ségrégation des domaines à E12.5, les cellules « trunk » forment un réseau tubulaire tridimensionnel composé d'un épithélium monostratifié. Ce canal primitif verra émerger des cellules exprimant le facteur de transcription Neurogenin3 (*Ngn3*), qui amorce la différenciation des cellules endocrines (Gu, Dubauskaite, and Melton 2002). Les cellules « trunk » n'exprimant pas *Ngn3* composeront quant à elles les canaux (S. Wang et al. 2010). Les travaux de Shih et collaborateurs révèlent que le niveau d'activité de la voie Notch régule l'induction de *Ngn3* via *Hes1* et *Sox9* (Shih et al. 2012)(figure 2).

La ségrégation des domaines « tip » et « trunk » signe non seulement le début de la différenciation cellulaire, mais aussi celui de la morphogenèse pancréatique. Les domaines « tip » sont sujets à d'importants phénomènes de « splitting » (littéralement de séparation) qui verront l'extension et la multiplication de branches, vraisemblablement grâce au FGF sécrété

par le mésenchyme (Miralles et al. 1999). L'interaction de ces branches avec le mésenchyme semble être également déterminante dans le maintien de l'identité acineuse comme le soulignent les travaux de Li et collaborateurs sur le rôle clef de la laminine-1 (Z. Li et al. 2004).

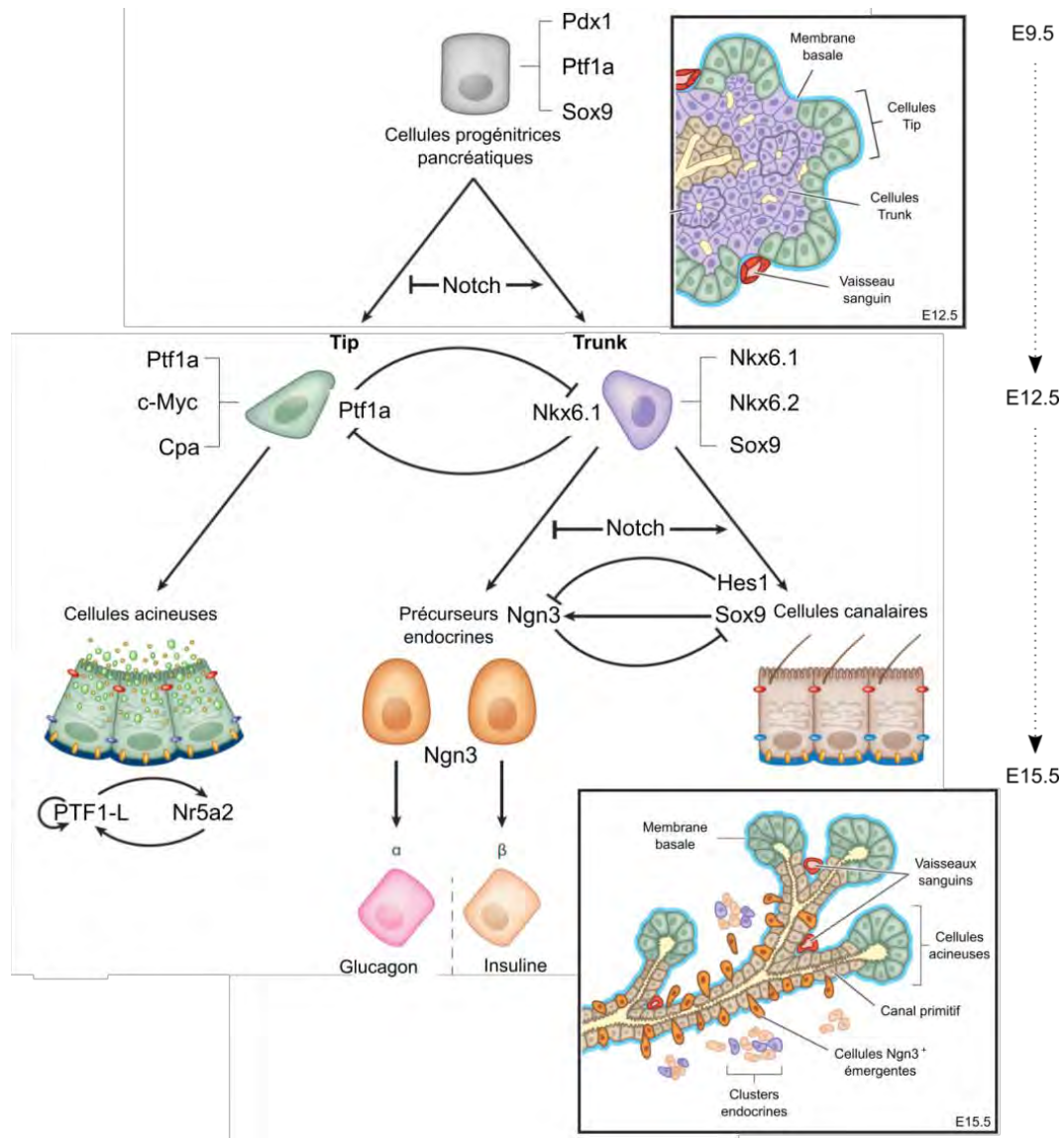


Figure 2 : Différenciation cellulaire et organogénèse du pancréas

À E9.5 s'amorce la transition primaire, au cours de laquelle les facteurs de transcription Pdx1, Ptf1a et Sox9 vont contribuer à l'expansion des cellules progénitrices pancréatiques et au maintien de l'identité pancréatique. La transition secondaire est initiée à E12.5 et s'étend jusqu'à la naissance. Au début de cette phase, les cellules progénitrices adoptent une identité tip ou trunk. La voie Notch favorise l'identité trunk et réprime l'orientation tip, tout comme la co-répression entre Ptf1a et Nkx6.1. Les cellules tip adoptent par la suite un phénotype acineux entretenu par une boucle régulatrice entre PTF1-L et Nr5a2. Les cellules trunk ont la capacité de se différencier en cellules canalaire ou endocrines. L'activation de la voie Notch favorise l'identité canalaire via l'activation de Hes1, un répresseur de Ngn3, et de Sox9, un activateur de Ngn3. Une faible activation de Notch conduit ainsi à une orientation endocrine. Adapté de Shih, Wang & Sander 2013.

3. Physiologie générale du pancréas

Le pancréas est une glande amphicrine hétérotypique : ses fonctions endocrine et exocrine sont assurées par deux grands types cellulaires distincts. Cette partie mettra l'accent sur la physiologie du compartiment exocrine, afin de mieux anticiper la physiopathologie de la pancréatite ainsi que de l'adénocarcinome pancréatique.

3.1. Composition du pancréas endocrine

La composante endocrine est représentée par les îlots de Langerhans, disséminés dans le parenchyme exocrine (**figure 1B,C**). Ces structures sont hautement vascularisées et innervées, permettant le contrôle de la sécrétion et le passage des hormones dans la circulation sanguine. Les cellules β sont majoritaires (75%) et produisent l'insuline (hormone hypoglycémiante), alors que les cellules α (20%), δ , ϵ et PP produisent respectivement le glucagon (hormone hyperglycémiante), la somatostatine (inhibition des hormones gastro-intestinales et pancréatiques), la ghréline (antagoniste de la leptine), et le polypeptide pancréatique (diminution des sécrétions exocrines).

3.2. Physiologie du pancréas exocrine

La composante exocrine représente entre 95 et 99% de la masse du pancréas adulte (**figure 1C**), et possède une structure ramifiée complexe composée de cellules acineuses, centro-acinaires et canalaire, ces dernières étant en continuité avec le tractus digestif. Les cellules acineuses produisent et sécrètent la majorité des enzymes nécessaires à la digestion des aliments, et possèdent pour cela la plus forte capacité de synthèse protéique de l'organisme. Cette capacité est permise par la présence d'un abondant réticulum endoplasmique granuleux ainsi que d'un performant système de stockage et sécrétion.

Les enzymes pancréatiques sont protéolytiques (trypsine, élastase), amylolytiques (α -amylase), lipolytiques (lipase) ou à activité nucléase (DNase, RNase) (Whitcomb and Lowe 2007). Certaines d'entre elles comme l' α -amylase sont présentes sous leur forme active dans la cellule. Cependant, la majorité sont des protéases et sont conservées dans un état inactif (proenzymes) au sein de granules de zymogène au pH acide, empêchant tout dommage intracellulaire.

Le transport et le relargage des granules de zymogène sont régulés par exocytose, elle-même stimulée par des hormones et des neurotransmetteurs. Ces médiateurs de la sécrétion (ou sécrétagogues) comprennent le GRP (gastrin releasing peptide), la CCK

(cholécystokinine), l'Ach (acétylcholine), le VIP (vasoactiv intestinal peptide) ou encore la sécrétine. Chacun de ces peptides possède un récepteur propre à la surface basolatérale de la cellule acineuse, dont l'activation déclenche une cascade de signalisation intracellulaire menant à l'exocytose via une libération de calcium (GRP, CCK et Ach) ou à une augmentation de l'AMPc (VIP et sécrétine) (Williams 2010). Lorsqu'elles ne sont pas sécrétées sous leur forme active, les proenzymes sont activées à leur arrivée dans le duodénum par une cascade enzymatique initiée par l'entéropeptidase résidente (Whitcomb and Lowe 2007) (**figure 3**).

Les cellules canalaire sont quant à elles responsables des sécrétions inorganiques (eau, sodium, potassium, chlore et bicarbonate), nécessaires au transport des enzymes vers la lumière intestinale et à la neutralisation de l'acide gastrique. La sécrétion de l'eau et des ions est régulée par la sécrétine et l'Ach. Cette stimulation, combinée à la forte activité de l'anhydrase carbonique au sein de l'épithélium canalaire, contribue à l'augmentation de la concentration en bicarbonate (jusqu'à 140mM) dans le jus pancréatique, optimisant ainsi le pH nécessaire à l'activité des enzymes digestives pancréatiques (Nishimori et al. 1999).

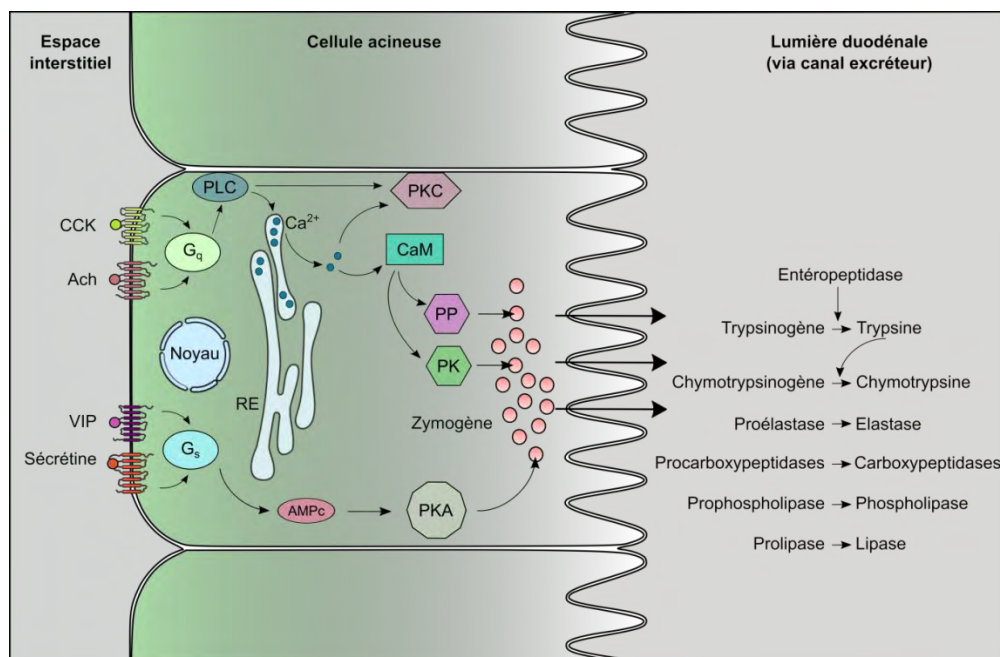


Figure 3 : La cellule acineuse et la synthèse des enzymes digestives.

La cellule acineuse possède au moins deux voies stimulant la sécrétion des enzymes digestives. L'Ach et la CCK activent une protéine Gq qui stimule la PLC. La PLC, en clivant le PIP2 en DAG et IP3, va activer la PKC (via le DAG) et induire un relargage massif de calcium (Ca²⁺) du réticulum endoplasmique (via l'IP3). Un taux élevé de calcium stimule par ailleurs la CaM, qui à son tour peut activer les PK et les PP, intervenant dans l'exocytose. Le VIP et la sécrétine activent une protéine Gs, qui stimule l'adénylyl cyclase et la production d'AMPc, menant à l'activation de la PKA.

B. Pathologies du pancréas exocrine

Comme évoqué précédemment, les cellules acineuses sont le lieu de production, de stockage, et de sécrétion des enzymes digestives. Ces activités, dont l'intensité n'est égale par aucun autre type cellulaire dans l'organisme, sont responsables d'un haut niveau de stress physiologique. Des conduites à risque tels que la consommation excessive d'alcool, un régime riche en graisses, ou la consommation de tabac, engendrent une augmentation de ce stress et favorisent l'apparition de la pathologie. Les principales atteintes du pancréas exocrine sont la pancréatite et le cancer du pancréas. De nombreuses données de la littérature indiquent que la cellule acineuse joue un rôle prépondérant dans l'apparition de ces maladies.

1. La pancréatite

La pancréatite est une pathologie inflammatoire se manifestant sous forme aiguë ou chronique, avec une grande variabilité dans la sévérité des atteintes. Les signes cliniques sont similaires dans les deux formes de la pathologie, et impliquent une douleur abdominale épigastrique qui le plus souvent irradie dans le dos. Il existe aussi des signes digestifs d'accompagnement comme les nausées ou les vomissements, associés à une distension abdominale.

1.1. La pancréatite aiguë

D'un point de vue histologique, la pancréatite aiguë est caractérisée par une nécrose des cellules acineuses, un œdème, et une infiltration du parenchyme pancréatique par des cellules de l'inflammation (**figure 4A**). Cet état inflammatoire entraîne aussi la formation de figures de métaplasie acino-canalaire, signe distinctif de cette pathologie. Bien qu'elle soit bénigne la plupart du temps, la pancréatite aiguë peut évoluer dans environ 15% des cas en une atteinte multi-organes pouvant engager le pronostic vital du patient. Différents facteurs environnementaux ou génétiques ont été mis en cause dans le développement de la pancréatite, néanmoins la majorité d'entre eux mène, indépendamment de l'étiologie, à une activation des granules de zymogène et à une inflammation de l'organe (Vonlaufen, Wilson, and Apte 2008).

Ainsi les facteurs dits environnementaux sont la consommation abusive d'alcool, de tabac, et la migration des calculs consécutifs à une lithiase biliaire. L'obstruction des canaux pancréatiques causée par ces calculs entraîne un blocage du flux d'enzymes, avec pour finalité une accumulation de granules de zymogène en intracellulaire qui fusionnent avec les

lysosomes. La cathepsine B lysosomale est par la suite capable d'activer les enzymes pancréatiques (Saluja et al. 1989). L'alcool affecte lui aussi le processus d'exocytose, mais en influant sur le mode de transport des granules et en déstabilisant leur membrane (Ponnappa et al. 1987). Ce véritable dogme de l'« autodigestion » de la cellule acineuse, selon lequel l'activation du trypsinogène constitue l'évènement initiateur, est désormais largement débattu. Les modèles animaux transgéniques révèlent ainsi que l'inflammation est aussi primordiale, via l'activation du facteur de transcription NF- κ B (Logsdon and Ji 2013).

Dès l'établissement du diagnostic, la prise en charge de la douleur demeure la priorité car elle constitue le premier symptôme. Lorsque l'étiologie implique l'alcool, le patient devra être suivi durant son sevrage. Dans tous les cas une « mise au repos » du pancréas est requise, incluant un jeûne et une prise en charge de l'hydratation et de l'alimentation (Janisch and Gardner 2015).

1.2. La pancréatite chronique

La pancréatite chronique est caractérisée au niveau histologique par une atrophie acinaire et l'apparition d'une fibrose, entraînant au niveau de l'organe une perte des fonctions endocrine et exocrine (**figure 4A**). Dans la majorité des cas, son apparition est la conséquence d'épisodes multiples de pancréatite aiguë alcoolique, et il semblerait que le maintien de l'état fibreux implique les cellules étoilées pancréatiques. De nombreuses études démontrent en effet que ces cellules quiescentes sont activées par l'état inflammatoire persistant, et adoptent un phénotype dit « myofibroblast-like », caractérisé par l'expression de l' α -SMA. Les facteurs sécrétés caractéristiques de la pancréatite tels que le TGF- β , le PDGF, ou les cytokines pro-inflammatoires sont par ailleurs capables d'activer la prolifération de ces cellules, et de stimuler leur production des composants de la matrice extracellulaire telle que la MMP2 (Phillips et al. 2003).

La pancréatite héréditaire est une cause rare de pancréatite chronique, avec une apparition de la maladie dès l'enfance, qui se manifeste par la récurrence d'épisodes de pancréatite aiguë. La première cause génétique décrite fut la mutation du gène *PRSS1* du trypsinogène cationique (R122H), menant à une autoactivation de l'enzyme, qui peut alors activer de manière persistante les granules de zymogène (Whitcomb et al. 1996). D'autres mutations ont été associées à la pancréatite héréditaire, telles la perte de fonction de CTSC ou celle de SPINK1, deux inhibiteurs de protéase normalement chargés de dégrader le trypsinogène (Rosendahl et al. 2008; Király et al. 2007).

Par ailleurs, certains patients atteints de fibrose kystique sont susceptibles de développer une pancréatite chronique (Cohn et al. 2005). En effet, certaines mutations du gène *CFTR* entraînent une perte de fonction de ce récepteur régulant la sécrétion de bicarbonate dans le système excréteur pancréatique. En conséquence, la viscosité du jus pancréatique est augmentée et l'obstruction du canal s'ensuit.

La prise en charge thérapeutique de la pancréatite chronique comprend à court terme un sevrage alcoolique et tabagique, ainsi qu'un traitement de la douleur non spécifique (antalgiques de niveau 1 ou 2) et de l'hyperpression canalaire et tissulaire (en seconde intention). Le contrôle de l'inflammation pancréatique et péri-pancréatique est effectué par traitement anti-inflammatoire et antalgique, mais peut faire appel à la résection chirurgicale en cas d'échec. A long terme, le traitement de l'insuffisance endocrine et exocrine devient la priorité, bien que la surveillance concernant l'apparition d'un cancer pancréatique soit recommandée, en particulier pour les patients atteints de pancréatite héréditaire (Maire et al. 2009).

1.3. La pancréatite induite par la céruléine

De nombreuses avancées dans la compréhension des mécanismes moléculaires de la pancréatite ont été permises par l'apport des modèles animaux. La pancréatite aigüe ou chronique peut être induite chez le rongeur par divers facteurs tels que les sécrétagogues, la L-arginine, le déoxycholate, l'alcool, la chirurgie obstructive ou encore les approches génétiques.

L'hyperstimulation par la céruléine est la méthode la plus utilisée. Il y a 40 ans, Lampel et collaborateurs démontraient que l'administration de doses excessives de sécrétagogues chez le rat causait une pancréatite aigüe (Lampel and Kern 1977). Un an plus tard, les travaux de Williams révélaient que de faibles doses de cholécystokinine ou de ses analogues (céruléine et pentagastrine) favorisent la sécrétion d'amylase, alors que des concentrations élevées la bloquent (Williams et al. 1978). Des travaux ultérieurs ont depuis démontré que ces fortes concentrations entraînent une réorganisation du cytosquelette d'actine empêchant la sécrétion, et une activation intracellulaire du trypsinogène, à l'origine des dommages observés dans les acini (Schäfer et al. 1998).

Alors qu'elle nécessite une perfusion en intraveineuse chez le rat et les rongeurs de plus grosse taille, la céruléine peut être simplement injectée en intra-péritonéale chez la

souris, classiquement par 6 à 7 injections espacées d'une heure. C'est la répétition de ces cycles qui conduira aux dommages intracellulaires de l'acinus dans un premier temps (blocage de la sécrétion, activation du trypsinogène), puis aux réponses inflammatoire et systémique dans un second temps (production de cytokines et chimiokines par les acini).

Ainsi la gravité de l'atteinte peut être mesurée par l'activation précoce du trypsinogène (dès 30 minutes chez la souris), puis par la fuite d'amylase dans le sérum due aux acini endommagés (hyperamylasémie), maximale à 1 heure après la dernière injection (Halangk et al. 2000). Les premiers infiltrats immunitaires sont observables dès 1 heure après la première injection de céruléine. En effet, les cellules acineuses sécrètent rapidement des cytokines telles que le TNF- α , l'IL-6, l'IL-1 β , et les chimiokines KC et MIP-2 (Grady et al. 1997). Il semblerait que les macrophages et les neutrophiles soient les cellules majoritairement recrutées, entretenant ainsi la sévérité de la pancréatite (Zaninovic et al. 2000).

Comme évoqué précédemment, la contribution relative de l'activation du trypsinogène et de l'inflammation à la pathogénie de la pancréatite est largement débattue, néanmoins ces deux facteurs semblent agir de concert. L'induction de pancréatites chez des souris déficientes pour le trypsinogène (T^{-/-}) démontre que sa présence est indispensable dans la phase précoce de dommages aux acini. En revanche, elle n'est pas requise pour l'évolution de l'inflammation locale et systémique, qui semble d'avantage impliquer le facteur de transcription NF- κ B (Dawra et al. 2011). De nombreuses études mettent en évidence le rôle clé de NF- κ B, activé très tôt dans la pancréatite et à l'origine de l'expression de nombreux gènes pro-inflammatoires. Une étude récente de Huang et collaborateurs révèle que l'activation de NF- κ B est corrélée à la gravité de la pancréatite et que son maintien conduit à une pancréatite chronique en 3 mois (Huang et al. 2013). Les travaux de Sah et collaborateurs confirment ces données, puisque l'induction de pancréatites aiguës répétées (2 inductions par la céruléine par semaine pendant 10 semaines) conduit à une pancréatite chronique chez les souris déficientes pour le trypsinogène ou pour la cathepsine B, alors que l'expression de NF- κ B est augmentée. Ainsi, l'inflammation semble être le véritable facteur déterminant l'évolution vers la pancréatite chronique.

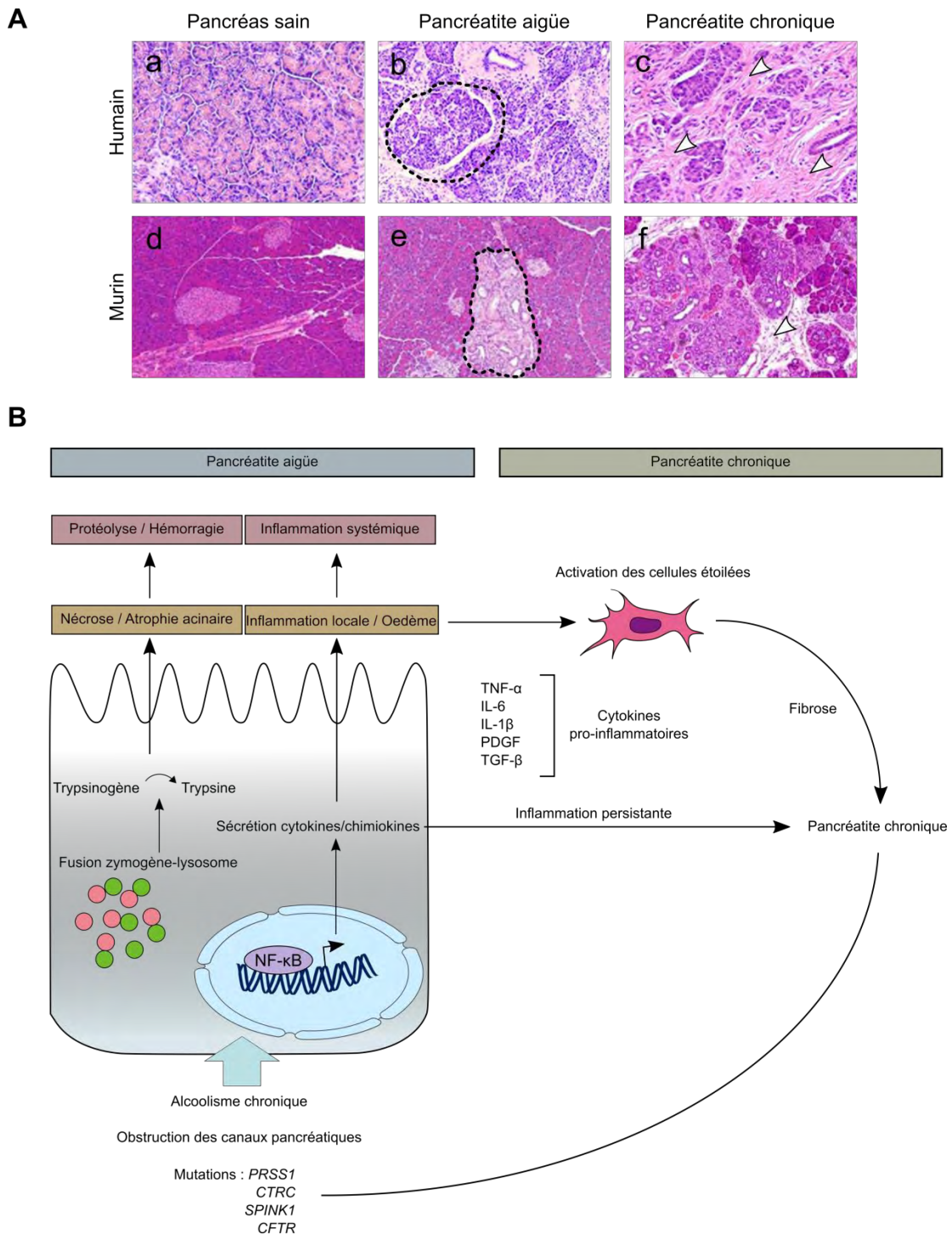


Figure 4 : Mécanismes et caractéristiques histologiques de la pancréatite

A) Sections de pancréas humains (a-c) et murins (d-f) sains (a, d), atteints de pancréatite aiguë (b, e) ou de pancréatite chronique (c, f). Les zones de métaplasie acino-canaulaire sont encadrées en pointillés, les flèches blanches indiquent des zones de fibrose. Adapté de Pan et al. 2011 et Kiraly et al. 2015. **B)** Schéma simplifié de la pathogenèse de la pancréatite aiguë et de la pancréatite chronique. L'apparition d'une pancréatite chronique peut être causée par la récurrence d'épisodes de pancréatite aiguë ou par des facteurs de prédisposition génétique.

1.4. La métaplasie acino-canalaire

D'un point de vue histomorphologique, la pancréatite induite par la céruléine est un excellent modèle, qui met en lumière le rôle central de la cellule acineuse dans la gravité et le maintien de la pathologie. En plus de la nécrose du tissu acinaire et du recrutement des leucocytes, un changement morphologique précoce lié à la pancréatite est la métaplasie acino-canalaire. Ce type de lésion se caractérise par une diminution de l'expression par la cellule acineuse de gènes propres à son identité, et par une augmentation de l'expression de gènes caractéristiques des canaux tels que *CK19*, *SOX9*, ou *KLF4* (Jensen et al. 2005; Wei et al. 2016). Au niveau structurel, la cellule acineuse se transdifférencie et adopte une architecture proche de la cellule canalaire, ou « duct-like ». Dans le modèle de pancréatite aigüe induite par la céruléine, ces lésions sont réversibles et les acini retrouvent leur identité au bout d'une semaine (**figure 5A**).

La forte présence de ces lésions métaplasiques dans la pancréatite chronique humaine a cependant soulevé la possibilité de leur implication dans l'entretien de l'inflammation. Murtaugh et Keefe proposent ainsi une hypothèse centrée sur le facteur NF- κ B et la métaplasie acino-canalaire, selon laquelle l'inflammation est promotrice de l'état transdifférencié des cellules acineuses (Murtaugh and Keefe 2015) (**figure 5B**). L'étonnante plasticité de la cellule acineuse, tout comme l'inflammation, semblent donc constituer des traits caractéristiques de la pancréatite aigüe et chronique. Ces phénomènes sont autant de points communs avec l'adénocarcinome pancréatique, dont l'émergence est vraisemblablement favorisée par une inflammation persistante (Guerra et al. 2007).

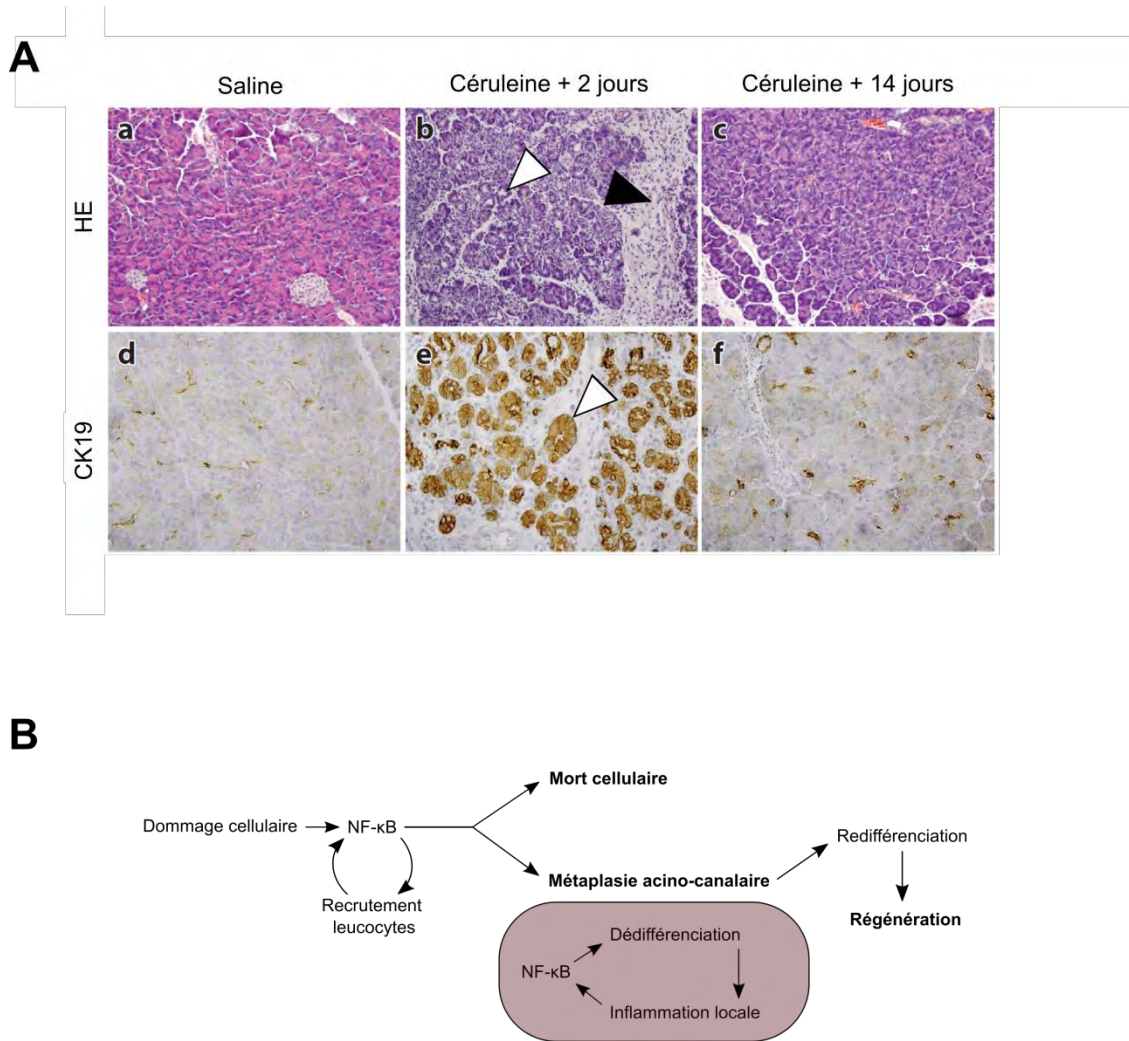


Figure 5 : La pancréatite induite par la céruléine

A) Sections de pancréas murins injectés avec une solution saline (a,d) ou avec de fortes doses de céruléine, 2 jours après la dernière injection (b,e) ou 14 jours après (c,f). Coloration en hématoxyline-éosine (a-c) ou immunohistochimie contre le marqueur canalaire CK19 (d-f). Les zones de métaplasie acino-canalaire (flèches blanches) et d'infiltrats immunitaires (flèche noire) sont étendues à 2 jours avec une forte expression de CK19 (marron) dans les cellules acineuses, alors qu'elles ont disparues à 14 jours. **B)** Le modèle de Murtaugh et Keefe : l'activation de NF-κB déclenche la métaplasie acino-canalaire qui entre dans une boucle de rétrocontrôle où l'inflammation locale, NF-κB, et l'état pseudo-canalaire s'activent mutuellement. Adapté de Murtaugh et Keefe 2015.

2. Les tumeurs malignes du pancréas exocrine

L'adénocarcinome pancréatique est la tumeur maligne exocrine la plus commune, et représente de 85% à 90% des néoplasmes pancréatiques. Néanmoins de nombreux autres types de néoplasmes peuvent se développer au sein du tissu exocrine, et sont classifiés en fonction de leurs caractéristiques morphologiques. Ces autres types de cancers sont considérés comme rares et à meilleur pronostic.

Les tumeurs intracanalaires papillaires mucineuses du pancréas (TIPMP) représentent entre 1 et 3% des cancers exocrines, mais leur incidence est en augmentation. Ces lésions sont dues à la prolifération de l'épithélium canalaire et sont caractérisées par une importante sécrétion de mucus, entraînant une kystisation des canaux secondaires et une dilatation du canal principal. Les TIPMP peuvent présenter une évolution histologique allant de l'adénome au carcinome invasif, cette dernière forme étant retrouvée dans 50% des résections. La survie varie sensiblement selon l'atteinte, et peut atteindre de 70 à 100% à 5 ans si le canal principal est épargné.

Les tumeurs pseudopapillaires et solides du pancréas (TPPSP) représentent moins de 2% des cancers pancréatiques et touchent essentiellement les jeunes femmes. D'un point de vue histologique, ces lésions sont extrêmement polymorphes et ne présentent pas de différenciation pancréatique. Malgré le volume imposant de la tumeur (jusqu'à 25cm de diamètre), le pronostic est généralement bon.

Les carcinomes à cellules acineuses sont des tumeurs solides présentant une hypersécrétion de lipase et de trypsine. Dans la moitié des cas ils sont métastatiques au moment du diagnostic, et présentent une survie relativement faible (0 à 6% à 5 ans). Les pancréatoblastomes sont des tumeurs embryonnaires malignes présentant aussi une différenciation acinaire, et qui sont majoritairement retrouvées chez l'enfant (moins de 40 cas adultes décrits dans la littérature) (Mulkeen 2006).

C. L'adénocarcinome pancréatique

L'adénocarcinome pancréatique (ADK) est la tumeur maligne du pancréas la plus fréquente. A l'échelle mondiale, il est le 12^{ème} cancer le plus répandu et la 7^{ème} cause de mort par cancer, tous sexes confondus. Dans les pays développés, son incidence gagne deux places alors que sa mortalité en fait le 4^{ème} cancer le plus meurtrier (GLOBOCAN 2012), avec une

survie à 5 ans de seulement 5%. Ainsi en France, 12580 patients ont été diagnostiqués d'un ADK en 2012, ce qui en fait la 2^{ème} cause de cancer digestif.

Les patients atteints d'un ADK se présentent la plupart du temps avec des symptômes non-spécifiques et hétérogènes, ce qui constitue le premier obstacle dans la prise en charge de ce cancer. Ceux-ci dépendent de la localisation de la tumeur, ainsi celles localisées dans le corps ou la queue du pancréas demeurent plus longtemps asymptomatiques que celles localisées dans la tête, et sont donc diagnostiquées plus tardivement.

Les douleurs abdominales ou dorsales sont souvent des signes précoces et traduisent un envahissement périspéal, prédictif d'un mauvais pronostic. L'ictère (jaunisse) est aussi un des premiers symptômes causé par une obstruction des voies biliaires, caractéristique d'une tumeur localisée dans la tête du pancréas. Une perte de poids, une asthénie et une malabsorption sont aussi observées fréquemment, tout comme le diabète (50% des patients).

Le diagnostic de l'ADK s'est relativement amélioré avec les progrès de l'imagerie et la possibilité de biopsies guidées, sous contrôle écho-endoscopique ou radiologique. La réalisation d'une biopsie est envisagée lorsque la tumeur apparaît localement avancée en imagerie ou qu'un traitement néo-adjuvant est prévu, dans le cas d'une tumeur résécable notamment. Elle peut aussi lever le doute sur une masse d'un autre type que l'ADK, comme les TIPMP. Dans 80% des cas, le diagnostic est confirmé à un stade avancé où le patient présente des métastases ou des extensions locorégionales, excluant toute option chirurgicale.

Avec les échecs successifs des combinaisons chimiothérapeutiques, la gemcitabine est resté l'agent de référence pendant plus d'une décennie (1997-2011) pour le traitement de l'ADK métastatique. Aujourd'hui, malgré l'émergence de nouveaux protocoles (FOLFIRINOX, gemcitabine plus *nab*-paclitaxel), le pronostic de ce cancer demeure sombre (**figure 6**).

1. Etiologie

1.1. Facteurs environnementaux

Le risque de développer un ADK augmente avec l'âge et affecte rarement les individus de moins de 45 ans, avec une médiane de diagnostic à 71 ans. Le principal risque environnemental est lié à la consommation de tabac, en particulier à cause de la nicotine, avec un risque relatif de 2 à 3. L'obésité est associée à un état inflammatoire chronique, qui

entretient l'environnement tumorigène, mais aussi à une insulino-résistance, qui favorise l'apparition du diabète de type 2. Le diabète de type 2 lui-même semble être favorable au développement d'un ADK (risque relatif : 2), alors qu'un diabète récent est plutôt considéré comme une conséquence de la néoplasie. Les patients atteints de pancréatite chronique non-héréditaire présentent un fort risque d'ADK (risque relatif 6 à 15), en revanche le dépistage n'est pas justifié à cause d'un risque absolu limité (4% à 20 ans).

1.2. Facteurs génétiques

Selon les études, la proportion d'ADK lié à une histoire familiale oscille entre 1 et 10% des cas. Les formes héréditaires sont classiquement séparées en deux groupes : les syndromes génétiques et l'agrégation familiale.

Le syndrome de Peutz-Jeghers est une maladie autosomique dominante causée par une mutation du suppresseur de tumeur *LKB1*. Les individus atteints présentent un risque 132 fois supérieur à la population générale de développer un ADK, avec un risque cumulé de 36% à 64 ans (Giardiello et al. 2000). Les mélanomes atypiques multiples familiaux (FAMMM) sont associés à une mutation du suppresseur de tumeur *CDKN2A* (*p16INK4A*). Certaines familles présentant une mutation de sous-type *p16-Leiden* ont un risque relatif compris entre 20 et 34 de développer un ADK, avec un risque cumulé de 17% à l'âge de 75 ans (Vasen et al. 2000). Le syndrome héréditaire de prédisposition au cancer du sein et de l'ovaire (HBOC) est associé à des mutations des gènes *BRCA1* et *BRCA2*. Il semblerait que les individus porteurs de la mutation de *BRCA2* présentent un risque jusqu'à 10 fois supérieur de développer un ADK, avec un risque cumulé de 5% au cours de la vie (Asperen et al. 2005). Le syndrome de Lynch (HNPCC) et la polypose familiale (FAP) prédisposent aussi à l'ADK, avec un risque 8,6 fois supérieur pour l'HNPCC et 4,6 fois supérieur pour la FAP.

Les syndromes de pancréatite héréditaire et de fibrose kystique évoqués plus tôt sont aussi à inclure dans les prédispositions génétiques à l'ADK. Les sujets atteints de pancréatite héréditaire, associée à la mutation de *PRSSI*, présentent un risque de 60 à 100 fois supérieur de développer un ADK, avec un risque cumulé de 40% au cours de la vie, pouvant atteindre 75% en cas de consommation de tabac (Rebours et al. 2008). La fibrose kystique, causée par la mutation du gène *CFTR* et à l'origine de la mucoviscidose, entraîne un risque relatif de développer un ADK de 5,3.

La forme familiale est définie par la présence d'un ADK chez au moins deux parents de premier degré du patient, ou au moins trois, quel que soit le degré de parenté. La proportion de patients âgés de moins de 50 ans est plus importante dans ces familles (16%) que dans la population générale. Par ailleurs, le risque de développer un ADK est augmenté de 2 à 3,7 fois par la consommation de tabac, avec une apparition de la maladie avancée de 10 ans. Les risques cumulés sont supérieurs pour les individus ayant trois parents de premier degré affectés (16-30%) que pour ceux en ayant deux (8-12%) (Rustgi 2014). Récemment, de grandes études d'association génétique pangénomiques (GWAS) ont permis d'identifier plusieurs loci de susceptibilité, notamment celle menée par une équipe de l'Université Johns Hopkins, qui incluait en tout 9925 ADK et 11569 contrôles sains, d'Amérique du Nord, d'Europe et d'Australie (Childs et al. 2015). Cette étude confirme les loci précédemment identifiés à proximité des gènes *ABO*, *KLF5*, *TERT*, *PDX1*, *NR5A2*, et met en évidence de nouvelles associations à proximité de *SUGCT*, *TP63* et *ETAA1*.

2. Traitements de l'adénocarcinome pancréatique

La survie médiane tout stade confondu est généralement inférieure à 6 mois, alors que le statut de tumeur « résécable » fait augmenter cette survie à 18 mois, faisant de la chirurgie la seule option considérée comme curative. L'âge des patients est souvent le premier critère analysé. Avec un pic d'incidence à 70 ans, la faisabilité d'une chirurgie pancréatique lourde telle que la duodéno-pancréatectomie céphalique (DPC ou Whipple) est souvent à remettre en question. Dans 80% des cas, les patients ne sont pas opérables et présentent pour la plupart des métastases à distance (foie et poumon majoritairement). Le traitement chimiothérapeutique est alors immédiatement envisagé.

2.1. Tumeur opérable

Les ADK opérables représentent de 15 à 20% des cas. En plus de l'âge, l'état général du patient, la présence de métastases à distance, ou l'envahissement local sont à prendre en compte. Au niveau locorégional, l'envahissement du réseau artériel est le principal critère d'exclusion, ainsi que l'envahissement des ganglions hépatiques, mésentériques et péritonéaux. Les tumeurs de la tête (70% à 80% des cas) sont opérées par duodéno-pancréatectomie céphalique et celles du corps ou de la queue par spléno-pancréatectomie gauche. Même en cas de résection complète de la tumeur, la survie médiane est de 18 mois avec un taux de survie à 5 ans inférieur à 20%. La chimiothérapie adjuvante (gemcitabine le plus fréquemment) sur 6 mois est désormais systématique en France, alors que les traitements

néoadjuvants chimiothérapeutiques peuvent être proposés en essais thérapeutiques pour les tumeurs dites « borderline » (Hammel et al. 2015).

2.2. Stade métastatique

Historiquement, très peu de molécules ont été utilisées dans le traitement de l'ADK. D'un point de vue histologique, les ADK sont caractérisés par un stroma excessivement dense, qui est vraisemblablement impliqué dans l'inefficacité des traitements (Olive et al. 2009). Depuis 1997, la gemcitabine constituait la chimiothérapie de référence pour le traitement de l'ADK métastatique, au vu des nombreux échecs visant à la combiner à d'autres agents. En 2011, le protocole FOLFIRINOX combinant 5FU, leucovorine, oxaliplatine et irinotecan a démontré une survie globale de 11,1 mois contre 6,8 mois pour le bras gemcitabine, dans une cohorte sélectionnée de patients (ECOG 0-1 ou bon état général et absence de cholestase) (Conroy et al. 2011). En 2013, la combinaison de la gemcitabine à des nanoparticules de *nab*-paclitaxel a démontré une survie de 8,5 mois contre 6,7 mois pour la gemcitabine seule (Von Hoff et al. 2013). Ces protocoles constituent désormais les traitements standards en première ligne pour les patients en bon état général. En pratique, seulement 25% et 45% des ADK métastatiques sont respectivement éligibles pour les protocoles FOLFIRINOX et gemcitabine plus *nab*-paclitaxel (Peixoto et al. 2015).

1. Anatomie pathologique

3.1. Les lésions prénéoplasiques

Il est désormais admis que l'ADK émerge à partir de lésions précancéreuses de bas grade, le plus fréquemment des PanIN (pancreatic intraepithelial neoplasia), et moins couramment des TIPMP et des cystadénomes mucineux (CM). Elles ont la particularité de se développer selon un processus séquentiel : dysplasie de grade croissant, cancer *in situ* et cancer infiltrant.

Les PanIN sont des lésions microscopiques non invasives classifiées en 3 catégories (PanIN-1, -2, -3) présentant une dysplasie croissante et une accumulation de mutations menant à la forme infiltrante. La mutation activatrice de l'oncogène *KRAS* et la mutation du suppresseur de tumeur *p16INK4A* sont fréquentes dans les lésions de bas grades (PanIN-1), alors que les PanIN-3 présentent en plus des mutations de *TP53*, *BRCA2* et *SMAD4*. De plus, les PanIN-1 sont communes dans le pancréas normal et considérées comme bénignes, alors

que les PanIN-3 sont fréquemment observées en bordure d'invasion des ADK métastatiques, suggérant un tournant « décisif » au stade PanIN-2 (Ying et al. 2016).

Le modèle linéaire de la progression de l'ADK est probablement simplifié, en effet aucune preuve moléculaire n'a établi de lien évolutif entre les PanIN-1, -2, -3 et l'ADK. De plus, il est probable que plusieurs voies mènent à l'ADK, et que les différentes PanIN soient d'origines cellulaires différentes. Au vu de sa morphologie, l'ADK a longtemps été considéré comme ayant pour origine la cellule canalaire, cependant les modèles transgéniques murins ont largement remis en question cette affirmation.

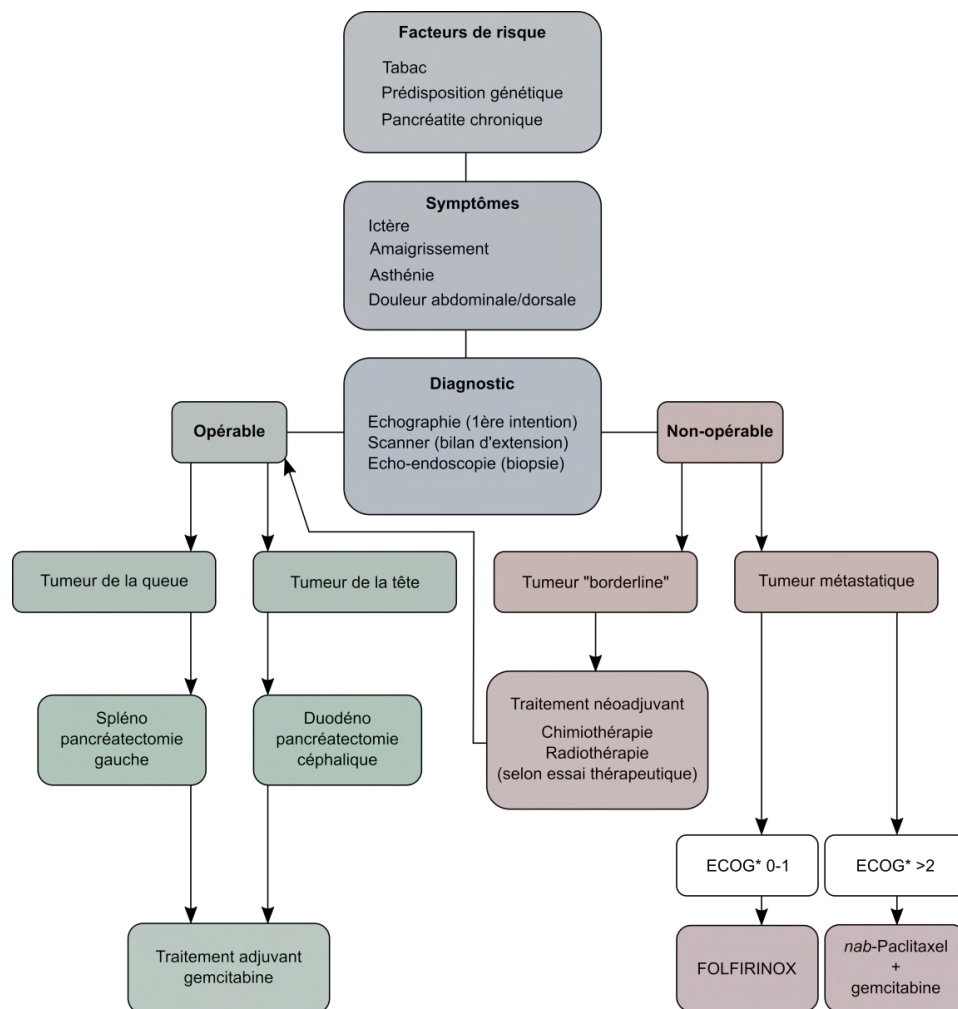


Figure 6 : Schéma simplifié de la prise en charge de l'ADK

*European Cooperative Oncology Group performance status. ECOG 0 : patient pleinement actif. ECOG 1 : restreint dans les activités physiques. ECOG 2 : patient ambulateur, debout plus de 50% de la journée. ECOG 3 : confiné au lit ou à la chaise plus de 50% de la journée. ECOG 4 : handicap total et confinement au lit.

3.2. Origine cellulaire

La mutation activatrice de l'oncogène KRAS est détectée dans 90% des ADK et constitue un évènement considéré comme initiateur de la carcinogenèse pancréatique. L'adressage spécifique de cette mutation au niveau du pancréas murin, grâce à l'activation de la Cre recombinase via les promoteurs de *Pdx1* ou *Ptf1a*, est devenu le modèle d'étude le plus courant (Hingorani et al. 2003a; Aguirre et al. 2003). Ce sont cependant des modèles d'adressage plus spécifiques utilisant les promoteurs de *Hnf1b*, *RIP* et *Mist1* qui ont respectivement permis de démontrer le potentiel malin des cellules canalaire, endocrines, et acineuses (J. M. Bailey et al. 2015; Friedlander et al. 2009). La relative résistance des cellules canalaire à la transformation et la présence de métaplasies acino-canalaire dans les ADK humains suggèrent cependant qu'une origine acinaire est à considérer comme majoritaire.

Deux études parues conjointement en 2014 révèlent que la transformation opérée par *KRAS* muté engendre une sous-population de PanIN similaires aux cellules tuft (retrouvées notamment dans l'épithélium pancréato-biliaire), et caractérisées par leur forte expression de *Dclk1* et *AcTub* (tubuline acétylée). Ces cellules peuvent être engendrées par une expression ectopique de *SOX17* dans les cellules acineuses, et forment une véritable population souche capable d'initier la carcinogenèse pancréatique (Jennifer M. Bailey et al. 2014; DelGiorno et al. 2014).

La transdifférenciation des différents types cellulaires du pancréas semble pour la majorité d'entre eux gouvernée par la réactivation de voies embryonnaires, et soulignent l'étonnante plasticité de cet organe. Au vu de la grande hétérogénéité morphologique et génétique caractéristique des tumeurs pancréatiques, ce constat donne du poids à la théorie selon laquelle la plupart des lignages ont la capacité d'engendrer des lésions pré-cancéreuses. Néanmoins, ces études menées chez la souris ne doivent pas faire oublier la complexité indéniablement supérieure de la pathogenèse humaine.

Bien qu'il soit impossible de prouver *in vivo* chez l'Homme que la cellule acineuse se transforme en PanIN, des travaux de lignage cellulaire tendent tout de même à considérer cette possibilité comme vraie (Houbracken et al. 2011). Cette hypothèse de l'origine acinaire chez l'Homme est aussi confortée par les études d'association génétique pangénomiques évoquées plus tôt, mettant en évidence des polymorphismes nucléotidiques (SNPs) associés au risque de développer un ADK. Ces SNPs se situent à proximité de facteurs de

transcriptions tels que *NR5A2*, essentiels au maintien de l'identité acineuse, et dont l'ablation chez la souris accélère la carcinogenèse induite par Kras muté (Figura et al. 2014).

Il est désormais évident que l'ADK, comme en atteste son hétérogénéité morphologique, est une pathologie aux multiples visages. Afin de parvenir à élaborer des thérapies adaptées, l'identification et la caractérisation de sous-types paraît nécessaire, tout comme le développement de nouveaux modèles d'étude, afin de dénombrer les nombreux mécanismes responsables de ce pronostic sombre.

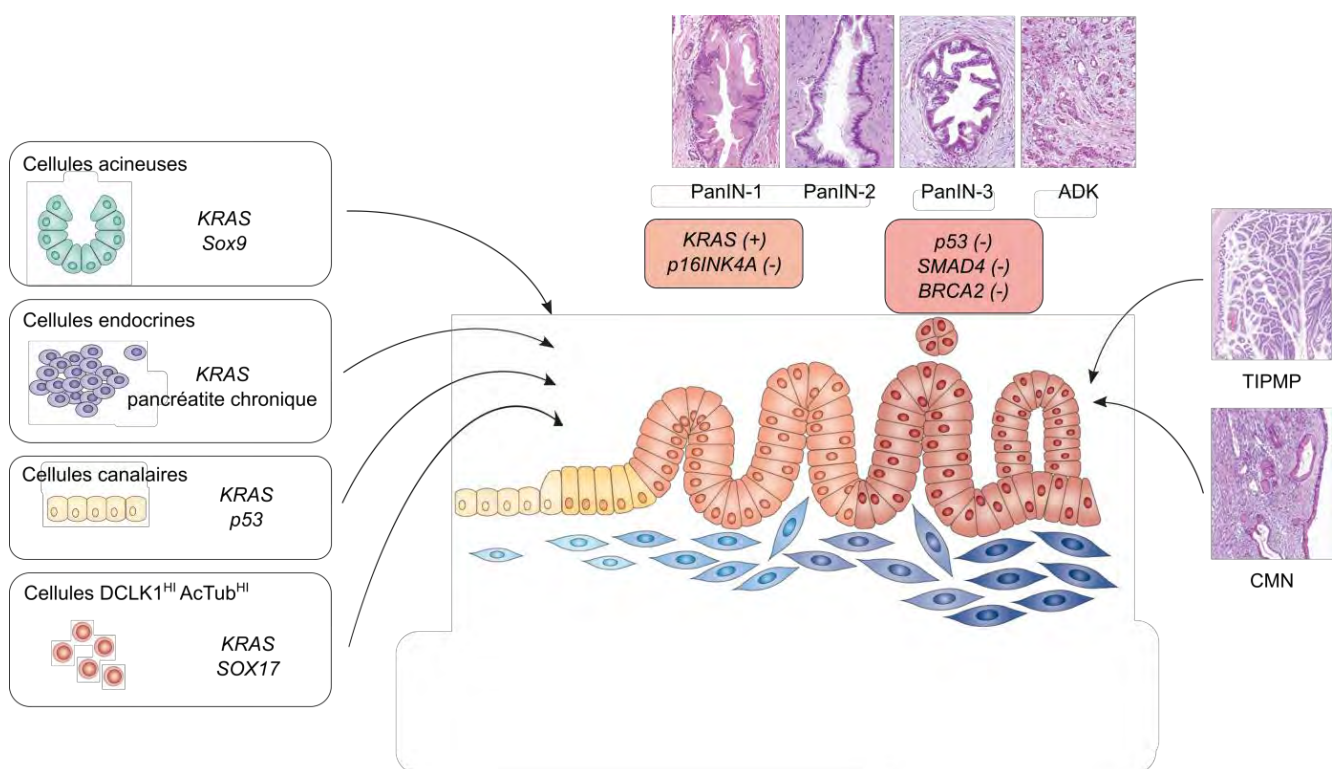


Figure 7 : Origines cellulaires et lésions précancéreuses

Les cellules acineuses, endocrines, canalaire et DCLK1^{HI} AcTub^{HI} (assimilées à des cellules tuft) ont toutes le potentiel de générer des lésions prénéoplasiques de type PanIN. Selon le modèle linéaire classique, les PanIN évoluent vers le stade de cancer *in situ* ou ADK via l'accumulation de mutations dans des oncogènes ou suppresseurs de tumeur. Alors que les lésions précoces présentent une mutation activatrice de *KRAS* et inactivatrice de *p16*, les stades plus tardifs présentent en plus des mutations inactivatrices de *p53*, *SMAD4* et *BRCA2*. Les lésions de type TIPMP et CMN peuvent aussi, dans une moindre mesure que les PanIN, évoluer en ADK. Adapté de Morris, Wang & Hebrik 2010 et Hezel et al. 2006.

CHAPITRE 2 : BASES MOLECULAIRES DE LA

CARCINOGENESE PANCREATIQUE

Malgré un nombre considérable de molécules passées au banc d'essai et la recherche intensive de cibles thérapeutiques, l'adénocarcinome pancréatique demeure l'un des cancers les plus mortels, et deux raisons majoritaires peuvent l'expliquer. En premier lieu, l'absence de dépistage systématique permettant d'établir un diagnostic à un stade « acceptable ». La recherche de marqueurs sensibles et spécifiques aux stades précoces de la pathologie relève donc d'une importance capitale. L'absence de traitement curatif et le nombre restreint d'options thérapeutiques constituent la seconde raison majeure. Depuis 1997 et jusque récemment, la gemcitabine était la seule chimiothérapie de référence. Aujourd'hui, malgré l'émergence de nouvelles cibles, aucune thérapie ciblée n'a démontré d'effet significatif dans le traitement de l'ADK.

Les grandes études génomiques réalisées au cours de la dernière décennie révèlent que l'hétérogénéité génétique interindividuelle et intra-tumorale est exacerbée dans l'adénocarcinome pancréatique. Dans une perspective de traitement personnalisé, cette hétérogénéité doit nécessairement être prise en compte dans la stratégie thérapeutique. L'essai clinique IMPaCT récemment débuté tentera ainsi pour la première fois de démontrer que la caractérisation génétique de tumeur à fin d'orientation du traitement est envisageable (Chantrill et al. 2015).

Si la description précise du « génome » de l'ADK est un prérequis à l'avènement de la thérapie personnalisé, l'apport des modèles animaux est indispensable à l'étude fonctionnelle des altérations génétiques recensées chez l'Homme, ainsi qu'aux phases précliniques. L'élaboration de modèles de plus en plus fidèles à la pathologie humaine a ainsi permis d'approfondir considérablement nos connaissances des bases moléculaires de l'ADK. Ce chapitre traitera de l'apport des diverses approches génétiques, de leur mise en relation et des essais thérapeutiques auxquelles elles ont abouti.

A. Génomique descriptive et fonctionnelle de l'adénocarcinome pancréatique

L'ADK est l'un des cancers les plus hétérogènes, caractérisé par une grande instabilité génétique incluant mutations, translocations, insertions/délétions, et aneuploïdie (Samuel and Hudson 2012). En 1988, Almoguera et collaborateurs décrivaient pour la première fois par PCR la mutation de *KRAS* dans 22 tumeurs, et émettaient l'hypothèse d'un évènement initiateur de ce cancer (Almoguera et al. 1988). Aujourd'hui, depuis l'initiative du Projet Génome Humain et grâce aux progrès accélérés du séquençage, le « génome » de l'ADK est de mieux en mieux caractérisé.

1. Les grandes études génomiques

1.1. Mutations « drivers » et hétérogénéité tumorale

Historiquement, l'ADK est caractérisé au niveau génétique par une accumulation séquentielle de mutations dans l'oncogène *KRAS* et les suppresseurs de tumeur *p16INK4A*, *p53* et *SMAD4*. La mutation activatrice de *KRAS*, détectée dans plus de 90% des tumeurs, est considérée comme l'évènement initiateur et promeut, selon le modèle classique, la progression du stade PanIN vers le cancer *in situ*. Dans ce modèle, l'avantage prolifératif des cellules cancéreuses est acquis au travers de l'inactivation de régulateurs du cycle cellulaire tels que *p16INK4A* (85%) et *p53* (50%), puis plus tardivement par l'inactivation de *SMAD4*, impliqué dans la voie du TFG- β (50%).

En 2008, les travaux de Jones et collaborateurs décrivent le premier séquençage d'exome de patients atteints d'ADK (Jones et al. 2008). Ces données révèlent que les mutations « drivers » récurrentes sont à intégrer dans un nombre restreint de voies moléculaires, dont elles signent la dérégulation (**figure 8**). Les auteurs présentent 12 voies moléculaires, dont les altérations respectives peuvent sensiblement varier d'un individu à l'autre. Alors que les voies WNT et Hedgehog sont altérées dans la totalité des tumeurs, la contribution des voies des intégrines (67%) ou des petites GTPases (79%) peut différer entre les patients.

Les auteurs soulignent l'exemple de deux tumeurs, ne présentant pas de gènes mutés en commun, mais rentrant toutes deux dans la « roue » des 12 voies altérées. Pour la voie du TGF- β , l'une présente une mutation de *SMAD4* alors que la seconde présente une mutation de

BMPT2, soulignant la diversité des gènes touchés au sein d'un même processus. L'exemple des leucémies et du ciblage d'un seul oncogène « driver » semble donc être une stratégie inappropriée pour le traitement de l'ADK. L'étude de Jones et collaborateurs suggère que la meilleure approche consisterait à cibler les effets physiologiques des dérégulations mises en évidence, plutôt que le ciblage de l'altération génétique en elle-même. Il apparaît alors évident que le ciblage d'effecteurs « clés » se situant au carrefour de plusieurs voies constitue la meilleure stratégie.

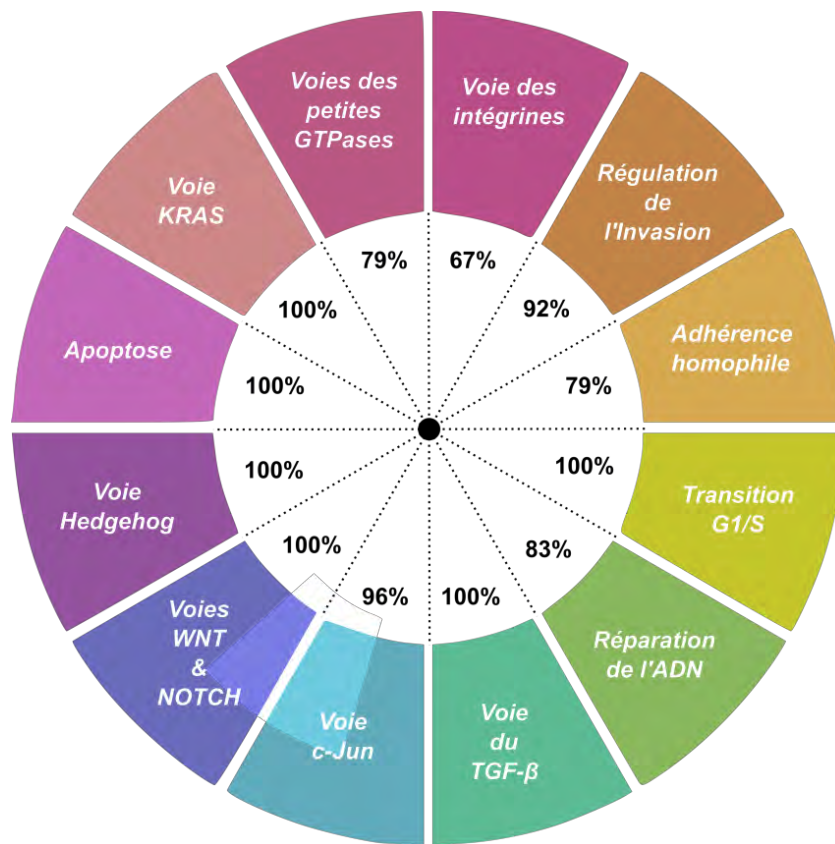


Figure 8 : Les 12 voies moléculaires altérées dans les ADK d'après Jones et al.

Représentation graphique des 12 voies moléculaires altérées dans les ADK d'après l'étude de Jones et al. sur une cohorte de 24 patients. Certaines voies présentent une altération génétique récurrente, telles que la voie KRAS (mutation de *KRAS*) ou la transition G1/S (mutation de *CDKN2A*). D'autres sont caractérisées par plusieurs altérations, telle que la voie du TGF- β (mutations de *TFGBR2*, *BMPT2*, *SMAD4*). Enfin, d'autres voies comportent une multitude de gènes altérés telles que la régulation de l'invasion (46 gènes mutés) ou les petites GTPases (33 gènes mutés).

Si l'hétérogénéité interindividuelle semble être à prendre en compte dans la personnalisation des traitements, les travaux de Campbell et collaborateurs ont permis de décrire avec précision la variabilité intra-tumorale et l'évolution de l'instabilité génétique de l'ADK (Campbell et al. 2010). Ces données collectées à partir de 13 patients mettent en évidence l'évolution continue de l'instabilité génétique au sein de la tumeur primaire, mais aussi au sein des métastases. Il semblerait qu'une évolution clonale soit initiée aux stades précoces de la carcinogenèse et que celle-ci se perpétue alors même que les métastases émergent. Ainsi, la variabilité des sites de colonisation des métastases accompagne une variabilité génétique, probablement résultante d'une adaptation à l'environnement de l'organe colonisé.

1.2. Les études de stratification : les sous-types d'ADK

La première étude de stratification des ADK est réalisée en 2011 par Collisson et collaborateurs (Collisson et al. 2011). Cette analyse transcriptomique est basée sur un profil d'expression de 62 gènes, et réalisée à partir de 27 résections tumorales, 19 lignées humaines et 15 lignées murines. Trois sous-types sont ainsi définis : classique (gènes d'adhésion et épithéliaux), exocrine-like (gènes d'enzymes digestives) et quasi-mésenchymateux (gènes mésenchymateux). Au-delà de leur identité moléculaire, qui semble prédire d'une sensibilité variable aux traitements, ces sous-types sont corrélés à des survies différentes. Ainsi les tumeurs classiques sont associées au meilleur pronostic alors que les tumeurs exocrine-like et quasi-mésenchymateuses présentent des survies considérablement réduites. Ces travaux démontrent par ailleurs que les sous-types sont retrouvés au sein des lignées murines utilisées, validant ainsi l'utilisation des modèles murins dans la recherche de traitements adaptés.

La création en 2008 de l'International Cancer Genome Consortium (ICGC) amorce la caractérisation génomique d'une cohorte prospective de plus de 25000 tumeurs, tout cancer confondu. Sous son égide, le projet « Pancreatic Cancer ICGC » revendique une cohorte prospective de plus de 1000 tumeurs, et publie régulièrement une mise à jour du génome de l'ADK, incrémentée de nouveaux échantillons.

En 2012, le consortium publie le séquençage d'une cohorte de 99 ADK et identifie de nouvelles mutations dans des voies telles que la modification de la chromatine, la réparation de l'ADN et le guidage axonal (Biankin et al. 2012). En dehors des mutations de *KRAS*, *p53*, *p16INK4A* et *SMAD4*, présentes dans plus de 50% des cas, les autres mutations s'avèrent avoir une prévalence de moins de 2%, soulevant la question de la pertinence fonctionnelle de

celles-ci. La comparaison de ces données à deux cribles indépendants *in vivo* et *in vitro* révèle que ces mutations ont une réelle implication dans la carcinogenèse pancréatique (voir plus bas les cribles génétiques chez la souris).

Une nouvelle analyse publiée en 2015 propose une classification des tumeurs en 4 sous-types basée sur le niveau de réarrangement chromosomique (Waddell et al. 2015)(**figure 9**). Les auteurs identifient dans le sous-type « instable » une prédominance des mutations de gènes impliqués dans la réparation de l'ADN, notamment *BRCA1*, *BRCA2* et *PALB2*. Grâce à une étude clinique prospective en parallèle, les auteurs parviennent à évaluer la réponse de 8 patients aux dérivés de platine, en fonction du sous-type de leur tumeur. Parmi les 5 patients affiliés à la catégorie « instable », 4 ont présenté une bonne réponse, dont un patient qualifié de « répondeur exceptionnel », avec une survie supérieure à 20 mois après rechute. Ces résultats encourageants sont par ailleurs confirmés par les traitements sur xénogreffes dérivées de patients (PDX).

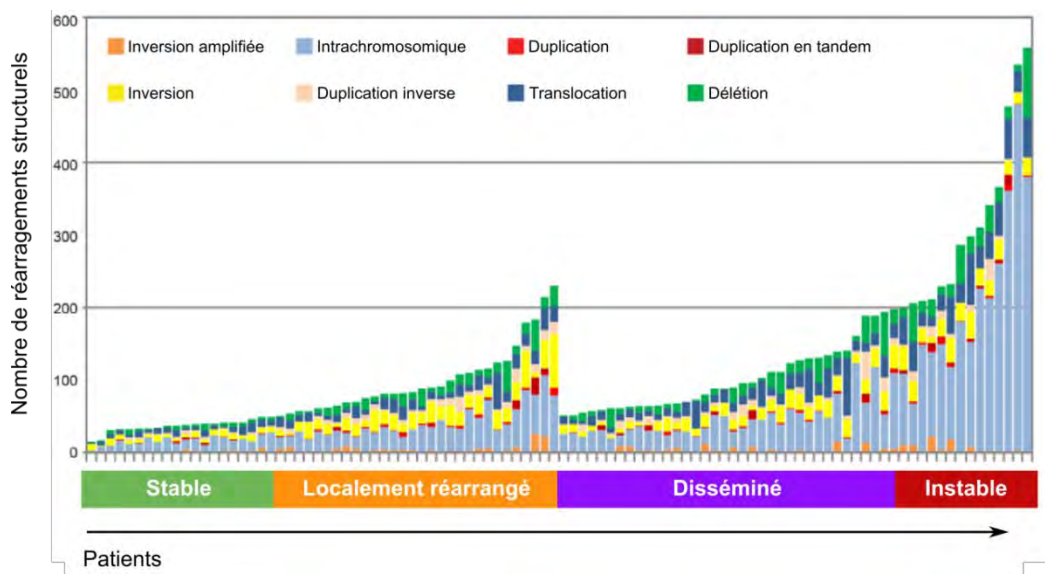


Figure 9 : Classification des ADK d'après Waddell et al.

Histogramme représentant le nombre et le type de réarrangements structuraux dans chacun des 100 ADK séquencés. Les tumeurs stables (20%) présentent moins de 50 réarrangements et une aneuploïdie récurrente, suggérant un défaut de cycle cellulaire/mitose. Le sous-type localement réarrangé (30%) peut être divisé en 2 groupes. Environ un tiers des tumeurs présente des régions d'amplifications d'oncogènes connus (KRAS, MET, ERBB2). Les deux tiers restants comportent des réarrangements complexes tels que les cassures-fusions ou les chromothripsis. Le sous-type disséminé (36%) inclut des tumeurs présentant moins de 200 réarrangements modérés. Les tumeurs du sous-type instable (14%) présentent un grand nombre de réarrangements (de 200 à 558), suggérant un défaut dans le maintien de l'intégrité de l'ADN et une sensibilité accrue aux dérivés de platine. Adapté de Waddell et al. 2015.

Un inconvénient majeur du séquençage à partir de tissus est la proportion de matrice mélangée au tissu tumoral de nature épithéliale. Ce stroma abondant est d'ailleurs une caractéristique de l'ADK, puisqu'il représente 70% de la masse tumorale. Cette faible cellularité représente ainsi un facteur d'exclusion considérable dans l'étude de Biankin et collaborateurs, où 43 patients sont exclus de l'analyse. La nature infiltrante de l'ADK signifie par ailleurs que le tissu tumoral inclut du pancréas sain et fonctionnel.

Les travaux de Moffitt et collaborateurs publiés en 2015 établissent pour la première fois une classification moléculaire tenant compte de la composante stromale de l'ADK (Moffitt et al. 2015). L'utilisation de la NMF (non-negative matrix factorization), une approche mathématique de séparation des sources, permet de distinguer les origines tissulaires des gènes, à partir de données de séquençage ou de puces d'expression, opérant une véritable « microdissection virtuelle ». Cet algorithme incluant une base de données issue de tissus sains permet de les exclure des analyses, et offre une caractérisation fidèle du tissu tumoral et stromal. En analysant ainsi « virtuellement » les profils d'expression de la tumeur et du stroma, les auteurs parviennent à définir 4 sous-types : tumeur classique, tumeur « basal-like », stroma normal, et stroma activé. Sur une cohorte de 108 patients, la signature moléculaire du stroma s'avère être déterminante dans le pronostic, avec une meilleure survie globale pour les stromas « normaux ». Il est à noter que le sous-type décrit auparavant comme « exocrine-like » par Colisson et collaborateurs est vraisemblablement exclu du fait de la soustraction des gènes de pancréas différencié par la NMF. Ce léger biais laisse supposer que la tumeur n'exprime aucun ARNm présent dans le tissu sain et différencié. Si cet aspect de l'analyse est discutable, cette dernière n'en reste pas moins informative sur les mécanismes moléculaires responsables de l'hétérogénéité tumorale. Cette dichotomie dans la stratification du stroma, au-delà de son impact sur la thérapie personnalisée, pourrait par ailleurs expliquer le rôle discuté de cette composante dans la progression tumorale.

L'analyse publiée en 2016 par l'ICGC pose de nouvelles bases dans la stratification des ADK, puisque cette nouvelle étude inclut le séquençage de 456 tumeurs, et propose 4 sous-types basés sur les réseaux transcriptionnels activés : squameux, progéniteur pancréatique, immunogène et ADEX (différenciation aberrante exocrine-endocrine) (Bailey et al. 2016). La carte des voies moléculaires altérées établie par Jones et collaborateurs est alors modifiée puisque 10 voies apparaissent fréquemment affectées (**figure 10A**). Au-delà de ces altérations globales, les auteurs parviennent à discriminer les 4 classes sur la base de 10 processus biologiques (**figure 10B**). En plus de leur similitude génétique, les tumeurs au sein

d'un même sous-type présentent une récurrence de formes histologiques particulières, comme la présence régulière de carcinomes adénosquameux dans le groupe squameux. Ce dernier sous-type est par ailleurs associé à la plus mauvaise survie, avec une mise en cause des mutations de *p53* et *TAp63*, démontrée dans les modèles murins conditionnels.

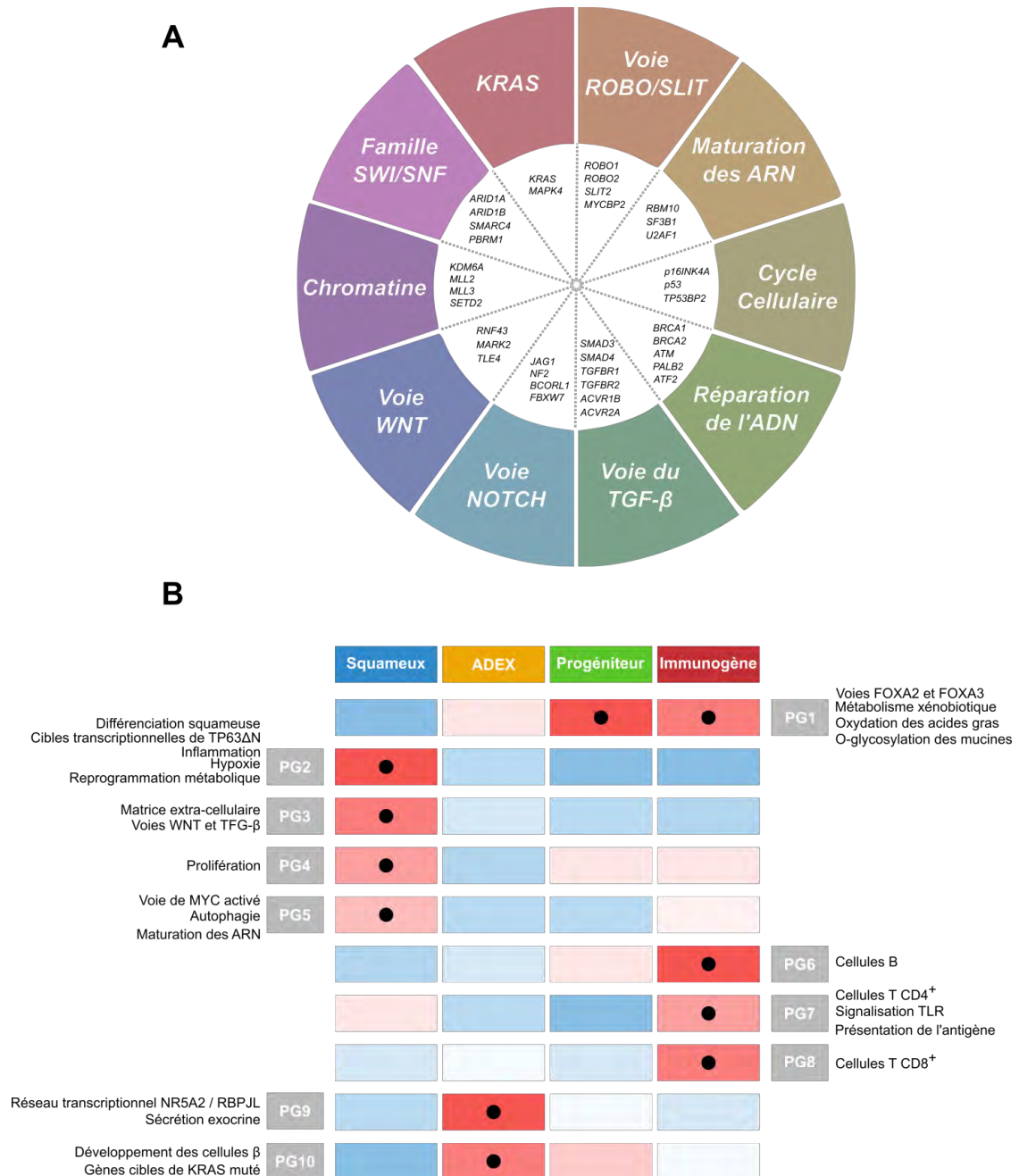


Figure 10 : Voies moléculaires altérées et classification des sous-types d'ADK d'après Bailey et al.

A) Représentation graphique des gènes et voies moléculaires altérés dans l'ADK (n=456). **B)** Heatmap des programmes génétiques (PG) définissant la classification en sous-types. Les points noirs marquent les programmes génétiques définissant la signature moléculaire de chaque sous-type. Adapté de Bailey et al. 2016.

Si cette classification englobe celles réalisées auparavant (Collisson et al. 2011; Moffitt et al. 2015), le nombre considérable d'échantillons de cette étude (n=456) affine le profil génétique des groupes décrits et permet de mettre en évidence un nouveau sous-type, immunogène. Les essais émergents d'immunothérapie basés sur l'utilisation de cellules CAR-T pourraient grandement bénéficier de ce type de stratification, selon les auteurs.

L'une des premières caractérisations moléculaires de tumeurs fut la description de deux sous-types de lymphomes B diffus à grandes cellules par Alizadeh et collaborateurs, dont la différence majeure mise en évidence fut le niveau de différenciation des cellules (Alizadeh et al. 2000). Par la suite, cette approche de stratification génétique s'est étendue à d'autres cancers et a permis l'amélioration de leur prise en charge, comme l'exemple du trastuzumab pour le traitement des tumeurs mammaires surexprimant le récepteur HER2 (Slamon et al. 2001).

La première stratification de tumeurs pancréatiques incluant un nombre significatif de patients est à attribuer aux travaux de Collisson et collaborateurs, 11 années après l'exemple des lymphomes non-Hodgkiniens. L'apport de ces données est considérable puisque la récente classification établie par l'ICGC à partir de 456 tumeurs englobe celle de Collisson, soulignant la pertinence de l'approche technique (**figure 11**). Si le biais soulevé par Moffitt et collaborateurs a permis de mettre en lumière la part déterminante du stroma dans la survie, le rôle de ce dernier demeure toujours sujet à controverse. Pour preuve, le sous-type immunogène décrit par Bailey et collaborateurs n'est corrélé ni à une forme normale ni activée du stroma (**figure 11**).

Il est très surprenant que les études de stratification moléculaire pour l'ADK soient si récentes, au vu de leur apport indéniable en cancérologie. Le concept selon lequel une telle caractérisation permettrait d'orienter le traitement de l'ADK s'est vu récemment confirmé par les travaux de Waddell et collaborateurs sur un échantillon restreint de patients, mais aux résultats prometteurs. La nouvelle classification établie par l'ICGC servira très certainement de base pour les futurs essais thérapeutiques dans l'ADK, qu'ils soient basés sur l'utilisation de chimiothérapies ou de molécules de thérapie ciblée.

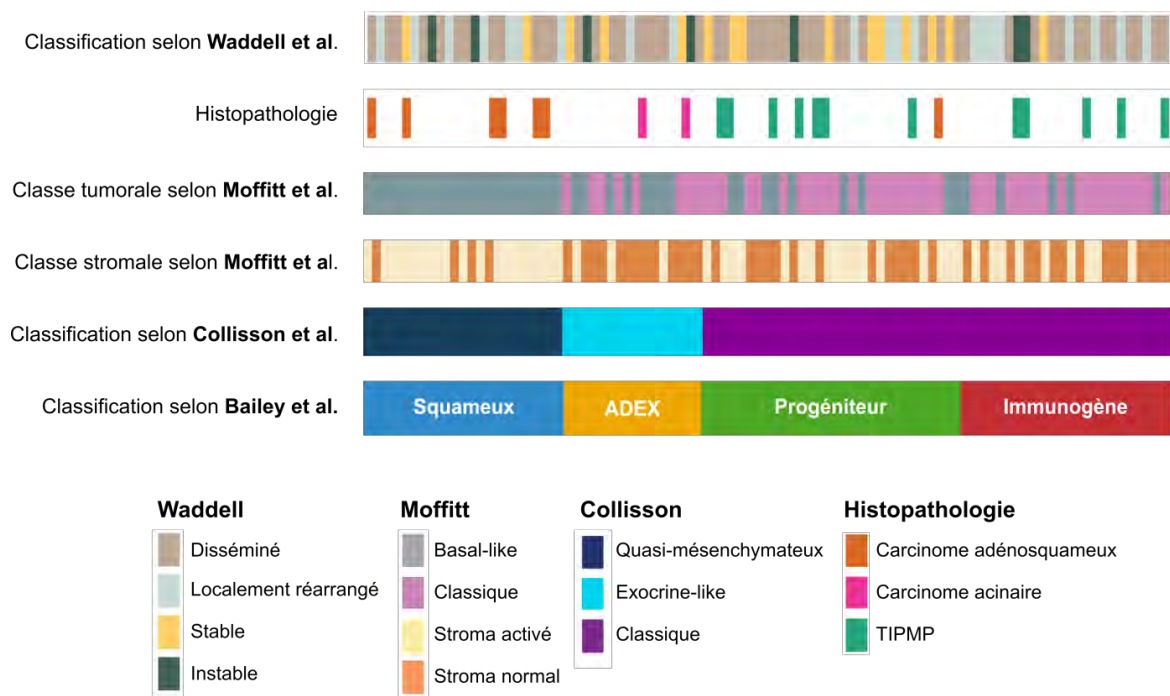


Figure 11 : Les différentes classifications des ADK

Comparaison graphique de 4 grandes études de stratification des ADK. Les classifications établies par Collisson et Bailey sont proches d'un point de vue stratégique et se recoupent en partie, bien que la puissance de la cohorte de l'étude de Bailey permette de faire émerger le sous-type immunogène du groupe classique de Collisson. Parmi les 2 classes tumorales définies par Moffitt, seule la classe basale semble superposer avec le type quasi-mésenchymateux ou squameux de Collisson et Bailey, respectivement. Les classes stromales ne semblent pas coïncider avec les autres classifications, démontrant une nouvelle fois le rôle complexe du microenvironnement. La stratification de Waddell ne tient compte que des réarrangements chromosomiques et détermine notamment la sensibilité aux dérivés de platine. Adapté de Bailey et al. 2016.

2. Les cribles génétiques chez la souris ou approches « forward »

Comme évoqué plus tôt, les études génomiques portant sur l'ADK et plus généralement sur les cancers, révèlent que les mutations les plus fréquemment retrouvées ne concernent qu'une minorité de gènes. Ces mutations « drivers » sont peu nombreuses et persistent vraisemblablement grâce à leur rôle clé dans la carcinogenèse. La majorité des mutations présentent une faible prévalence et sont qualifiées de « passagers ». Elles s'accumulent au cours de la pathogenèse et leur impact, bien qu'inconnu, peut sembler négligeable. Leur importance pourrait cependant être masquée par l'hétérogénéité caractéristique des cancers, plus encore par celle de l'ADK. Si les études génomiques

permettent de recenser ces mutations, la génomique comparative permet d'étudier leur occurrence chez la souris et leur véritable conséquence sur la progression tumorale.

La mutagenèse insertionnelle utilisée en génétique « forward » a permis de mettre en évidence de nombreuses voies moléculaires et de gènes coopérant avec *KRAS* muté dans la carcinogenèse pancréatique, notamment grâce aux systèmes de transposition *Sleeping Beauty* et *piggyBac*.

Les transposons sont des éléments génétiques mobiles se propageant dans le génome par un mécanisme « couper/coller » ou par l'intermédiaire d'un ARN et d'un mécanisme « copier/coller » (rétrotransposons). Les transposons endogènes sont ubiquitaires dans le génome des vertébrés, constituant jusqu'à 45% des séquences d'ADN, mais demeurent silencieux du fait de mutations inactivatrices acquises au cours de l'évolution. L'introduction de transposons exogènes permet une mutagenèse insertionnelle dans un large spectre de tissus, et donc la génération de nombreux modèles de cancers (DeNicola et al. 2015).

2.1. Le système *Sleeping Beauty*

En 2012, Mann et collaborateurs identifient de nouvelles mutations accélératrices de la carcinogenèse pancréatique, en combinant le système de transposition *Sleeping Beauty* à un modèle murin d'ADK (**figure 12**). Les souris exprimant *Kras* muté au niveau du pancréas (*Pdx1-Cre ; lsl-Kras^{G12D}*) présentent des lésions plus évolutives et invasives après croisement avec les souris exprimant un dispositif de transposition au locus Rosa26 (*Rosa26-lsl-SB11*) (Mann et al. 2012). La localisation et l'orientation des insertions de transposons peut prédire de la fonction du gène candidat. Ces insertions ont lieu proche de l'extrémité 5' des oncogènes dans la même orientation, où le fort promoteur du transposon permet la surexpression. En revanche, les insertions au sein des suppresseurs de tumeurs sont distribuées dans la région codante, avec des orientations variables, où l'inactivation est permise par la présence d'une séquence polyA bidirectionnelle dans le transposon. L'amplification par méthode de splinkerette PCR des zones d'insertion, puis leur séquençage permet d'obtenir une carte précise des gènes candidats.

L'étude réalisée par Mann et collaborateurs révèle 543 gènes candidats, dont la plupart sont retrouvés dans les analyses génomiques réalisées auparavant (Jones et al. 2008; Campbell et al. 2010). De manière plus surprenante, les gènes les plus significativement mutés de leur

analyse sont *Pten*, dont seule la perte d'hétérozygotie a été décrite dans l'ADK, et *Usp9x*, dont le rôle suppresseur de tumeur n'a jamais été étudié pour aucun cancer.

L'analyse similaire réalisée par Pérez-Mancera et collaborateurs dans un fond génétique *Rosa26-lsl-SB13* identifie *Usp9x* comme étant le gène le plus affecté de leur crible (Pérez-Mancera et al. 2012). Leur étude révèle que l'expression de la déubiquitinase USP9X est perdue dans les lésions cancéreuses pancréatiques et que cette perte est corrélée à un mauvais pronostic chez les patients atteints d'ADK. La génération d'un modèle murin *Pdx1-Cre ; Kras^{G12D} ; Usp9x^{fl}* confirme l'apport du crible *Sleeping Beauty* puisque la survie de ces souris est nettement diminuée comparée aux *Pdx1-Cre ; lsl-Kras^{G12D}*.

2.2. Le système *piggyBac*

L'utilisation du système *piggyBac* dans un modèle *Pdx1-Cre ; lsl-Kras^{G12D} ; Rosa26-lsl-PB ; ATP1-S2* par Rad et collaborateurs donne lieu à un nouveau crible de gènes candidats coopérant avec KRAS muté dans l'ADK (Rad et al. 2015)(**figure 12**). Bien que certains gènes identifiés soient communs aux analyses réalisées avec le système *Sleeping Beauty*, il semblerait que le système *piggyBac* soit plus sensible pour l'identification d'oncogènes, vraisemblablement en raison de la différence des séquences d'insertion. Ainsi *Foxp1* et *Foxp2*, qui n'étaient pas retrouvés dans le crible *Sleeping Beauty*, sont mis en évidence par cette nouvelle étude. L'expression de FOXP1 et FOXP2 est augmentée dans les lésions cancéreuses pancréatiques et s'avère être corrélée au statut métastatique chez les patients.

2.3. Utilisation du système CRISPR/Cas9 et modèle sporadique

L'utilisation des modèles transgéniques, si elle ne possède aucun équivalent reconnu, possède des limitations notables telles que le temps de génération des souches ou la difficulté à recréer la nature sporadique du cancer humain. Le système procaryote CRISPR/Cas9 s'est depuis peu révélé comme une méthode fiable d'édition du génome et de modélisation des cancers chez l'animal (W. Xue et al. 2014). L'utilisation d'ARN guides (sgRNA) permet d'adresser spécifiquement la nucléase Cas9 au locus ciblé et d'induire une cassure double-brin de l'ADN. Ces lésions sont réparées par une NHEJ imparfaite qui peut être exploitée pour induire des insertions/délétions en hétérozygote ou homozygote.

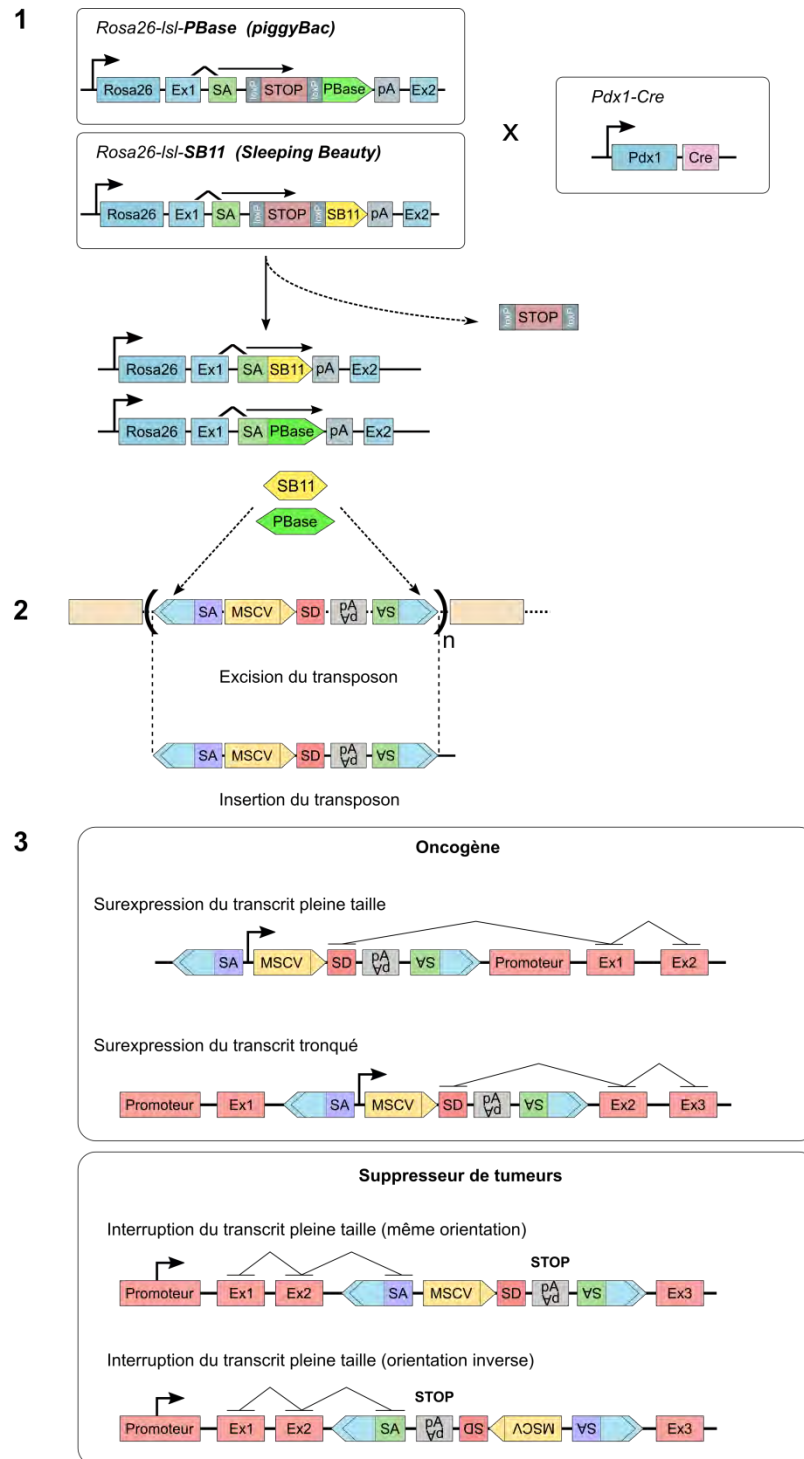


Figure 12 : Les systèmes de transposition *Sleeping Beauty* et *piggyBac*

1) Le croisement des souris *Sleeping Beauty* et *piggyBac* avec les *Pdx1-Cre-Kras^{G12D}* permet une excision par la Cre recombinase du codon stop et l'activation des transposases, spécifiquement dans le pancréas. 2) Les transposases excisent les multiples copies des transposons T2Onc à partir de concatémères et les insèrent au niveau de séquences TA ou TTAA. 3) Le transposon T2Onc promeut l'expression d'oncogènes lorsqu'il est intégré en amont ou à l'intérieur du gène, dans la même orientation. La présence de 2 sites accepteurs d'épissage et une séquence poly-A bidirectionnelle permet la terminaison de transcriptions de suppresseurs de tumeurs lorsque le transposon est intégré à l'intérieur du gène, quelle que soit l'orientation.

Publiés très récemment, les travaux de Maresch et collaborateurs décrivent un modèle d'ADK basé sur l'utilisation du système CRISPR/Cas9 chez la souris (Maresch et al. 2016). Réalisée dans un modèle *p48-Cre ; lsl-Kras^{G12D}*, la transfection en « multiplex » de 15 ARN guides ciblant des suppresseurs de tumeur accélère le développement de l'ADK comparé aux sgRNA neutres. En plus de recréer l'aspect « mosaïque » caractéristique de l'ADK, le modèle démontre la possibilité de réaliser des cribles négatifs. En effet, parmi les 15 gènes ciblés, seule la mutation de *Brca2* n'est pas retrouvée, suggérant une sélection négative des clones ayant subi cette altération. Ces données confirment ainsi de précédents travaux démontrant que l'inactivation de *Brca2* inhibe le développement de lésions initié par *Kras* muté (Rowley et al. 2011).

En identifiant de nouveaux gènes impliqués dans la carcinogenèse pancréatique, et en confirmant leur statut « driver », les études de crible génétique se sont avérées être complémentaires des analyses génomiques globales. La complexité des voies moléculaires contribuant au développement de l'ADK étant maintenant évidente, la seule identification de mutations par les études génomiques semble insuffisante dans une perspective de caractérisation fonctionnelle. En effet, la plupart des gènes fréquemment mutés possèdent une multitude de cibles et de partenaires, comme en attestent les nombreuses conséquences de la mutation de KRAS. Les cribles génétiques permettent de déceler les effecteurs clés de ces voies moléculaires, qui s'avèrent être souvent de meilleures cibles thérapeutiques.

B. Modèles murins et génomique fonctionnelle de l'ADK

1. Modéliser l'ADK chez la souris

1.1 Les modèles conditionnels

Alors que la modélisation de l'ADK faisait encore appel à des approches chimiques à la fin des années 1980, c'est la génération du modèle murin *lsl-Kras^{G12D}* en 2001 (appliqué au poumon) qui amorcera le développement des modèles génétiques d'ADK (Jackson et al. 2001). La cassette STOP en amont de l'exon 1 du gène est excisée au niveau des séquences loxP par la recombinaise bactérienne Cre et permet l'expression d'une forme constitutivement active de la GTPase Kras, au niveau de son locus endogène.

En 2003, les travaux de Hingorani et collaborateurs décrivent le premier modèle murin récapitulant toutes les étapes de la carcinogenèse pancréatique, de manière fidèle à la pathologie humaine (Hingorani et al. 2003b). En croisant des souris exprimant la Cre recombinase sous la dépendance d'un promoteur pan-pancréatique (*Pdx1-Cre*) aux souris *lsl-Kras^{G12D/+}*, les auteurs adressent l'expression de *Kras* muté spécifiquement au pancréas (**figure 13**). A 8 semaines, les souris développent des lésions de type PanIN-1 et évoluent lentement vers le stade d'ADK. Le modèle KC (*Pdx1-Cre ; lsl-Kras^{G12D/+}*) a ainsi fourni la preuve que la seule mutation de *Kras* suffit à initier la carcinogenèse pancréatique chez la souris, quand les modèles de mutation conditionnelle de *p16*, *p53* ou *Smad4* n'ont pas donné lieu à l'apparition de PanIN. Néanmoins, l'évolution lente des lésions et la faible occurrence d'ADK ont considérablement limité l'utilisation de ce modèle en étude pré-clinique.

Les animaux triples transgéniques combinant la mutation de *Kras* à la perte ou mutation d'un suppresseur sont désormais les plus utilisés (**figure 13**). Le modèle caractérisé par Aguirre et collaborateurs présente une délétion homozygote du locus *Cdkn2a* (codant pour p16 et p19) combinée à la mutation de *Kras* (Aguirre et al. 2003). Ces souris (*Pdx1-Cre ; lsl-Kras^{G12D/+} ; Ink4a/Arf^{lox/lox}*) développent des ADK avec une cinétique rapide, une forte agressivité et des métastases, entraînant la mort de la totalité des animaux à 11 semaines.

Plusieurs modèles furent développés afin de préciser l'importance de la perte de *SMAD4* dans les ADK humains. Le modèle murin combinant la mutation de *Kras* et la perte du récepteur 2 au TFG- β présente une apparition rapide de PanIN et une progression vers l'ADK avec une survie médiane de seulement 8 semaines, sans métastases et avec peu de diversité histologique (Ijichi et al. 2006). Au contraire, les deux groupes ayant généré le modèle combinant la mutation de *Kras* et la perte de *Smad4* rapportent l'apparition de tumeurs kystiques, de type TIPMP ou CMN, avec évolution vers l'ADK (Izeradjene et al. 2007; Bardeesy et al. 2006).

Le modèle le plus utilisé en étude pré-clinique combine la mutation inactivatrice de *p53* (*p53^{R172H}*) à celle de *Kras*. Ce modèle généré par Hingorani et collaborateurs (*Pdx1-Cre ; lsl-Kras^{G12D/+} ; Trp53^{R172H/+}*) présente une médiane de survie de 5,5 mois (Hingorani et al. 2005). Dans 80% des cas des métastases sont observées à des sites identiques à l'humain (foie, poumon et péritoine).

Malgré leurs nombreux avantages, ces constructions présentent certaines limites, mettant en cause les promoteurs de *Pdx1* et *p48*. Le fait qu'ils soient impliqués dans le

développement d'autres organes entraîne l'apparition de « fuites » avec pour conséquence le développement de papillomes vulvaires ou périauriculaires, entre autres (Hingorani et al. 2003b; Hingorani et al. 2005). Par ailleurs, le fait que la forme mutée de Kras soit exprimée dès l'embryogenèse ne reflète pas le caractère sporadique de la pathologie humaine.





Construction	Phénotype	Référence
 <p><i>Pdx1-Cre ; Isl-Kras^{G12D/+}</i></p> <p><i>Pdx1</i> → Cre recombinase</p> <p><i>Kras</i> → STOP (loxP) → *G12D Ex1</p>	<p>Longue latence</p> <p>Lésions type PanIN</p> <p>Médiane de survie : 14 mois</p>	Hingorani et al. 2003
 <p><i>Pdx1-Cre ; Isl-Kras^{G12D/+} ; Isl-Tp53^{R172H/+}</i></p> <p><i>Pdx1</i> → Cre recombinase</p> <p><i>Kras</i> → STOP (loxP) → *G12D Ex1</p> <p><i>Tp53</i> → STOP (loxP) → *R172H Ex5</p>	<p>Développement tumorale rapide</p> <p>Lésions type ADK différencié</p> <p>Métastases (63%)</p> <p>Médiane de survie : 5.5 mois</p>	Hingorani et al. 2005
 <p><i>p48-Cre ; Isl-Kras^{G12D/+} ; Smad4^{fllox/fllox}</i></p> <p><i>p48</i> → Cre recombinase</p> <p><i>Kras</i> → STOP (loxP) → *G12D Ex1</p> <p><i>Smad4</i> → Ex8 (loxP)</p>	<p>Développement tumorale rapide</p> <p>Lésions type TIPMP</p> <p>Métastases (18%)</p> <p>Médiane de survie : 8 mois</p>	Izeradjene et al. 2007
 <p><i>Pdx1-Cre ; Isl-Kras^{G12D/+} ; Ink4a/Arf^{fllox/fllox}</i></p> <p><i>Pdx1</i> → Cre recombinase</p> <p><i>Kras</i> → STOP (loxP) → *G12D Ex1</p> <p><i>Ink4a/Arf</i> → Ex2 Ex3 (loxP)</p>	<p>Développement tumorale rapide</p> <p>Lésions type ADK</p> <p>Micrométastases (11%)</p> <p>Médiane de survie : 11 semaines</p>	Aguirre et al. 2003

Figure 13 : Principaux modèles murins conditionnels d'ADK

Les modèles murins conditionnels sont caractérisés par une expression de la Cre recombinase restreinte à un tissu particulier. Dans les modèles présentés ci-dessus, l'expression de la recombinaise est permise par les promoteurs des facteurs de transcriptions spécifiques au pancréas tels que Pdx1 et p48. L'activation de la recombinaise et son excision des séquences loxP encadrant le codon STOP permet l'expression d'un allèle muté de Kras à son locus endogène et dans l'ensemble des cellules progénitrices pancréatiques.

1.2. Les modèles inductibles

En 2012, deux groupes décrivent un système d'expression inductible de *Kras* muté, spécifiquement au niveau du pancréas, et réversible (*p48-Cre* ; *R26-rtTa-IRES-EGFP* ; *TetO-Kras^{G12D}*, ou « *iKras* »)(**figure 14A**). Les travaux de Collins et collaborateurs mettent en évidence le rôle clé de *Kras* muté dans le maintien des lésions cancéreuses, puisque « éteindre » l'oncogène entraîne une réversion des lésions et une régression tumorale (Collins et al. 2012).

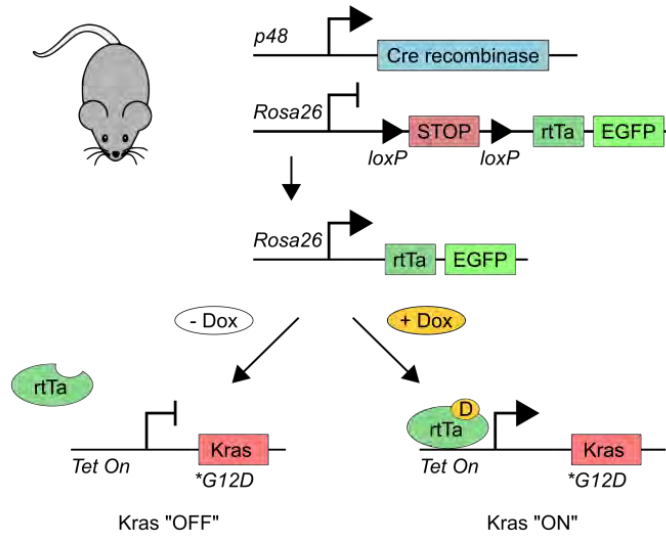
Les données de Ying et collaborateurs mettent quant à elle en évidence une « reprogrammation métabolique » consécutive à l'induction de *Kras* muté. L'expression de la forme mutée de l'oncogène déclenche une suractivation des voies anaboliques du glucose, ainsi qu'une augmentation de la biosynthèse des riboses (Ying et al. 2012). Le même groupe a plus récemment identifié grâce à ce modèle inductible une voie moléculaire responsable de rechutes malgré l'arrêt de l'expression de *Kras* muté (Kapoor et al. 2014). Ces travaux mettent en évidence le couple de facteurs de transcription Yap1/Tead2, en aval de la voie de signalisation Hippo, comme responsable du maintien de la prolifération en l'absence d'expression du transgène *iKras*. L'analyse transcriptomique de ces tumeurs murines révèle une corrélation avec le sous-type quasi-mésenchymateux décrit chez l'humain par Collisson et collaborateurs, caractérisé par une moindre dépendance à *Kras* muté et une survie diminuée (Collisson et al. 2011).

L'approche utilisée par Schönhuber et collaborateurs permet d'effectuer deux événements de recombinaison successifs (Schönhuber et al. 2014). Alors que la seule utilisation du système *Cre-loxP* n'autorise qu'une séquence de recombinaison, l'ajout du système *Flp-FRT* permet un événement additionnel et la reproduction de l'aspect séquentiel de la pathologie humaine. Les auteurs développent ainsi un modèle permettant l'expression de *Kras* muté, puis ultérieurement la délétion de *p53* induite par le tamoxifène (*Pdx1-Flp* ; *FSF-Kras^{G12D/+}* ; *FSF-R26^{CAG-CreERT2/+}* ; *Trp53^{lox/lox}*), se rapprochant ainsi de la cinétique observée dans les lésions humaines (**figure 14B**). Dans leur étude, l'injection de tamoxifène à l'âge de 2 mois permet l'expression de la *Cre* recombinase et le développement rapide d'ADK dû à la délétion de *p53*, alors que les souris non-traitées ne présentent que des lésions de type PanIN, de manière similaire au modèle KC conditionnel.

A

p48-Cre ; Rosa26-rtTa-IRES-EGFP ; TetO-Kras^{G12D} "iKras"

(Collins et al. 2012 ; Ying et al. 2012)



B

Pdx1-Flp ; FSF-Kras^{G12D/+} ; FSF-Rosa26CAG-CreER^{T2/+} ; Trp53^{lox/lox}

(Schönhuber et al. 2014)

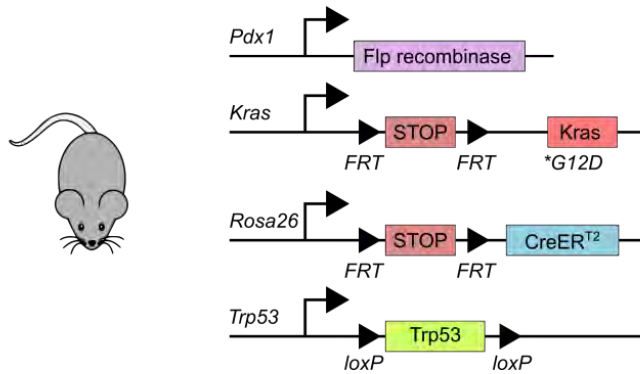


Figure 14 : Principaux modèles murins inductibles d'ADK

A) L'expression de la Cre recombinase dans le pancréas entraîne une excision du codon STOP au locus Rosa26, permettant l'expression du transactivateur dépendant de la tétracycline (rtTa). Une fois ajoutée, la doxycycline se lie au rtTa qui peut alors activer le promoteur Tet, en aval duquel se situe un allèle muté de *Kras*, aussi au locus Rosa26. **B)** L'expression de la Flp recombinase dans le pancréas permet l'excision de la cassette STOP flanquée de séquences FRT, et donc la transcription de *Kras* muté. L'ajout de tamoxifène permet l'activation de la Cre recombinase et l'excision de *Trp53*.

2. Modèles murins et recherche de cibles thérapeutiques

Les modèles décrits précédemment ont permis de reproduire l'ADK chez la souris de manière très fidèle à la pathologie humaine, et sont pour certains utilisés en routine dans les phases précliniques. Il est néanmoins surprenant de constater que parmi les principaux oncogènes impliqués, aucun ne possède d'inhibiteur direct en phase d'essai clinique. En effet, comme évoqué plus tôt, ces oncogènes ou suppresseurs de tumeurs mutés signent la dérégulation de voies moléculaires mais ne constituent que rarement la meilleure cible thérapeutique. La mise en évidence de processus et effecteurs « ciblables » a classiquement recours à la génération de modèles murins génétiques, qui permettent de mimer *in vivo* l'inhibition pharmacologique ou au contraire l'activation du médiateur incriminé (**figure 15**).

2.1. En amont et en aval de KRAS

En 2007, un essai clinique combinant la gemcitabine à un inhibiteur de l'EGFR (Erlotinib) a démontré un effet bénéfique, mais dans un nombre trop restreint de patients pour obtenir une application au traitement de l'ADK (Moore et al. 2007). Le récepteur à l'EGF se situant en amont de la voie de signalisation de KRAS, son inhibition ne devrait avoir aucun effet si l'on considère la mutation activatrice de KRAS comme quasi-universelle. Les mutations de l'EGFR et de KRAS sont d'ailleurs mutuellement exclusives dans les cancers du poumon non à petites cellules et les cancers colorectaux, où l'utilisation de l'Erlotinib est restreinte aux patients exprimant KRAS sauvage. Néanmoins, les travaux de Navas et collaborateurs ont permis de révéler un rôle prépondérant de l'EGFR dans le développement de l'ADK (Navas et al. 2012). La génération de souris combinant la mutation de Kras et la délétion de l'EGFR (*Elas-tTA/TetO-Cre ; lsl-Kras^{G12V} ; Egfr^{lox/lox}*) met en évidence une augmentation de la survie et un retard dans l'apparition des lésions PanIN.

Il semblerait que d'autres récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK) puissent être ciblés dans le développement de l'ADK. Les travaux de Weissmueller et collaborateurs décrivent une boucle cell-autonomous liant p53 muté au récepteur PDGFR β (Weissmueller et al. 2014). L'expression de la forme mutante de p53 la plus fréquente (R172H) se lie au facteur p73, l'empêchant de séquestrer le complexe NF-Y, qui peut alors activer la transcription de PDGFR β . L'utilisation d'un inhibiteur de RTK (Imatinib) dans le modèle KPC ne démontre cependant pas d'effet bénéfique sur la survie mais empêche la survenue de métastases. Les

auteurs établissent par ailleurs une corrélation entre le fort niveau d'expression du PDGFR β et une réduction de la survie sans métastases dans une cohorte de patients (n=98).

En aval de KRAS, les principales voies effectrices sont la voie des MAP kinases (RAF/MEK/ERK) et la voie PI3K (PI3K/PTEN/AKT). Parmi les kinases RAF, BRAF est généralement considérée comme l'effecteur dominant de KRAS dans l'activation de la voie. Les travaux de Collisson et collaborateurs démontrent que l'activation de la voie des MAP kinases par un mutant conditionnel *Braf*^{V600E} chez la souris (*Pdx1-Cre*^{ERT2} ; *Braf*^{CA/+}) entraîne l'apparition de PanIN et le développement de l'ADK, avec un phénotype plus agressif que dans le modèle KC (Collisson et al. 2012). L'implication de BRAF^{V600E} dans l'ADK semble négligeable au vu de sa faible occurrence (3% des PDAC), néanmoins sa présence dans 30% des tumeurs exprimant KRAS sauvage laisse supposer que certains patients pourraient répondre au Vemurafenib (Witkiewicz et al. 2015).

Les travaux de Pettazzoni et collaborateurs réalisés dans le modèle iKras révèlent que le ciblage pharmacologique de la voie MAPK n'aboutit qu'à un effet cytostatique, quand l'extinction génétique de *Kras*^{G12D} (par retrait de la doxycycline) entraîne la mort par apoptose dans un modèle cellulaire en trois dimensions (Pettazzoni et al. 2015). Alors que la perte de *Kras*^{G12D} entraîne une inactivation des voies MAPK et PI3K, l'inhibition de MEK1 par l'AZD6244 provoque une hyperactivation d'AKT, ainsi qu'une activation des RTK EGFR, AXL et PDGFR α . Les auteurs soulignent ainsi l'étonnante dépendance de l'ADK à la voie PI3K et mettent en évidence l'amplification d'AKT (présente dans 10 à 20% des ADK) comme facteur de résistance à l'inhibition de MEK et des RTK.

L'importance de la voie PI3K et la pertinence de son ciblage dans le contexte de l'ADK sont soutenues par de nombreux travaux. Plusieurs études démontrent que la contribution des sous-unités catalytiques est inégale, mettant en évidence une importance majoritaire de p110 α dans l'initiation et le développement de l'ADK, au détriment de p110 β (Baer et al. 2014; Wu et al. 2014). Les travaux de Eser et collaborateurs vont dans ce sens puisque l'expression d'une forme constitutivement active de p110 α (H1047R) dans le pancréas engendre le même phénotype que *Kras*^{G12D} (Eser et al. 2013). Les auteurs démontrent par ailleurs que la délétion de *Pdk1* empêche la cancérisation initiée par *Kras*^{G12D}, renforçant l'importance de la voie PI3K dans le développement de l'ADK.

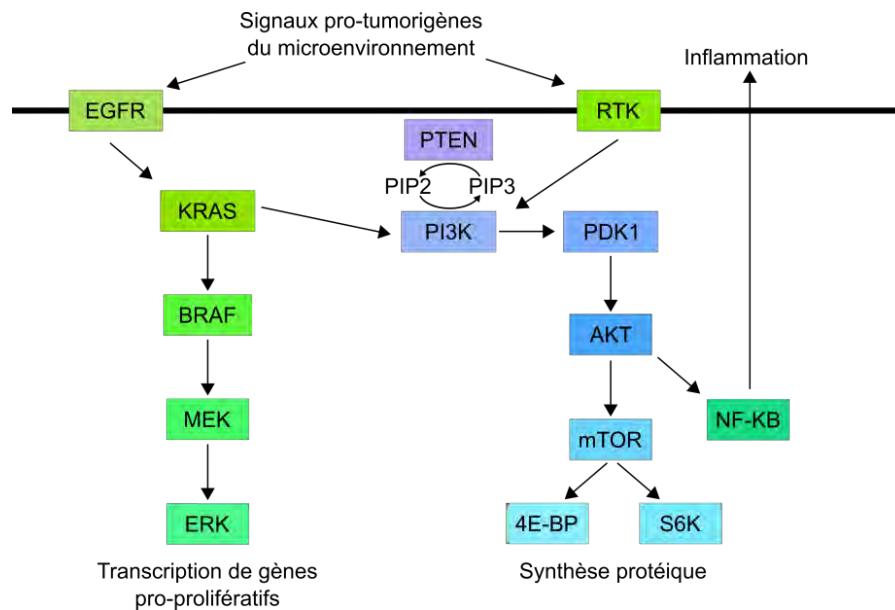
L'hyperactivation de la voie PI3K dans les ADK peut être expliquée par la forte occurrence de la perte de fonction de son antagoniste, PTEN, qui est sous-exprimée ou perdue

dans près de 70% des ADK (n=54) (Ying et al. 2011). Le rôle suppresseur de tumeur de PTEN est soutenu par le développement accéléré de l'ADK et son caractère particulièrement agressif dans un modèle murin combinant sa perte à la mutation de *Kras* (Hill et al. 2010). Les travaux de Ying et collaborateurs mettent en évidence une activation de la voie NF- κ B consécutive à la perte de PTEN, engendrant une forte réaction stromale et la production de cytokines pro-inflammatoires.

Les données de Morran et collaborateurs obtenues dans le même modèle KC PTEN révèlent une meilleure réponse de ces tumeurs à un inhibiteur allostérique de mTOR (rapamycine), en comparaison au modèle KPC (Morran et al. 2014). Leur hypothèse attribue l'effet anti-prolifératif à l'inhibition de la S6K1, via son action sur la synthèse des pyrimidines. Par ailleurs, les auteurs établissent un parallèle avec les travaux de Khalaileh et collaborateurs qui démontrent l'importance de la phosphorylation de la protéine S6 dans le développement de l'ADK (Khalaileh et al. 2013). Dans cette dernière étude, l'expression d'une forme non-phosphorylable de S6 dans le modèle KC retarde l'apparition des lésions PanIN et l'évolution vers l'ADK.

Cette dernière comparaison faite par Morran et collaborateurs entre leurs données et celles de Khalaileh est cependant approximative : l'effet de mTORC1 sur le métabolisme des pyrimidines, s'il nécessite l'intervention de la S6K1, met en jeu l'enzyme CAD (carbamoyl-phosphate synthetase 2, aspartate transcarbamylase, and dihydroorotase) et non la protéine ribosomique S6 (Ben-Sahra et al. 2013). De plus, les travaux de Khalaileh proposent un lien entre rpS6 et les dommages à l'ADN, mais n'incriminent pas la prolifération cellulaire. Les phénotypes mis en évidence dans les 2 études impliquent donc vraisemblablement des mécanismes distincts.

Par ailleurs, le fait que 4E-BP1 ne soit pas déphosphorylée dans les tumeurs de souris traitées à la rapamycine est attendu, puisque l'incapacité de cette dernière à inhiber complètement mTORC1 est démontrée par de nombreuses études (Choo et al. 2008; Pourdehnad et al. 2013). De récents travaux ont mis en évidence une implication de l'axe mTORC1-S6K dans l'initiation de tumeurs coliques déficientes pour *Apc*, au travers de la régulation de l'élongation de la traduction (Faller et al. 2015). Contrairement à l'axe mTOR-4E-BP1, la S6K est totalement inhibée par la rapamycine et semble jouer un rôle prépondérant dans la carcinogenèse colique. Si l'hypothèse n'est pas discutée par Morran et collaborateurs, leurs données suggèrent tout de même que les tumeurs pancréatiques déficientes pour *PTEN* pourraient présenter cette même particularité.



Cible	Impact sur le développement de l'ADK	Référence
EGFR	Les souris <i>Pdx1-Cre ; Kras^{G12D/+} ; Egfr^{-/-}</i> ont une survie prolongée comparée aux KC	Navas et al. 2012
PDGFRβ	L'imatinib empêche la survenue de métastases dans le modèle KPC	Weissmueller et al. 2014
BRAF	L'activation constitutive de Braf (<i>Braf^{V600E}</i>) dans le modèle KC accélère le développement tumoral	Collisson et al. 2012
p110α	L'inactivation de p110α (<i>p110α^{-/-}</i>) empêche l'apparition de lésions dans le modèle KC	Wu et al. 2014 ; Baer et al. 2014
PDK1	L'inactivation de Pdk1 empêche l'apparition de lésions dans le modèle KC	Eser et al. 2013
PTEN	La perte de Pten (<i>Pten^{-/-}</i>) accélère le développement tumoral dans le modèle KC	Hill et al. 2010
rpS6	L'expression rpS6 non phosphorylable (<i>rpS6^{P^{-/-}}</i>) retarde l'apparition des lésions dans le modèle KC	Khalaileh et al. 2013

**Figure 15 : Principales cibles thérapeutiques en amont et en aval de KRAS muté
au sein de la cellule cancéreuse**

2.2. Microenvironnement : inflammation et immunosuppression

Le stroma de l'ADK est caractérisé par une forte réaction desmoplasique et peut constituer jusqu'à 90% du volume de la tumeur. Cette véritable coque fibreuse est constituée de myofibroblastes, de cellules suppressives telles que les cellules myéloïdes suppressives (MDSC), les T régulateurs, les macrophages associés aux tumeurs (TAM) et de composants acellulaires tels que le collagène, les cytokines et les facteurs de croissance. Cette réponse desmoplasique unique résulte vraisemblablement de l'activation de voies paracrines et autocrines entre les cellules cancéreuses et le microenvironnement.

Le rôle du stroma dans le développement de l'ADK et la résistance thérapeutique est largement discuté. Les travaux d'Olive et collaborateurs ont permis de mettre évidence la faible perfusion des tumeurs dans le modèle KPC et sont parvenus à augmenter l'efficacité de la gemcitabine en la combinant à un inhibiteur de la voie SHH (IPI-926) (Olive et al. 2009). L'échec thérapeutique de la molécule en phase II souligna cependant le rôle ambigu de la voie SHH dans l'ADK et la nécessité de mieux comprendre son implication. Le groupe de K. Olive développa ainsi un modèle murin combinant l'expression de Kras muté à la délétion de Shh (Rhim et al. 2014). Ce modèle révèle que la voie Shh joue un rôle suppresseur de tumeurs, puisque les souris *Shh^{flox/flox}* présentent une vascularisation augmentée jouant en faveur d'une expansion de la tumeur, ainsi qu'une survie diminuée de moitié. Le modèle génétique rejoint ainsi l'approche pharmacologique visant à inhiber le médiateur Smoothed et révèle un aspect anti-tumoral du stroma.

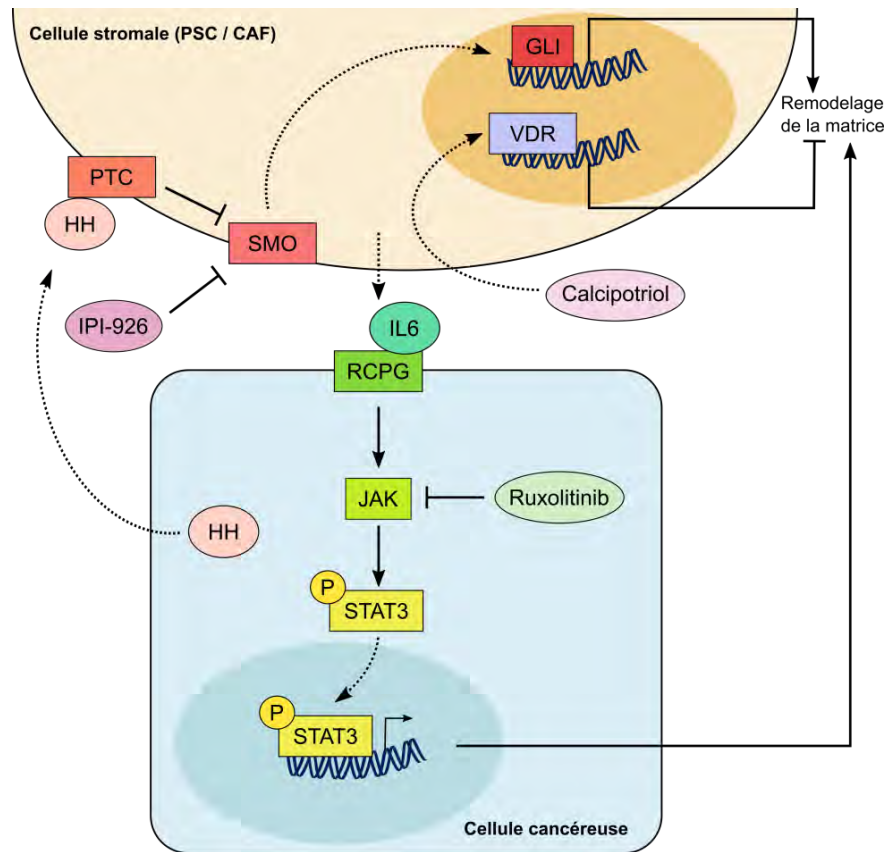
Le récepteur à la vitamine D (VDR) fut récemment identifié comme un inhibiteur de l'activation des cellules étoilées pancréatiques en fibroblastes associés au cancer (Sherman et al. 2014). Les travaux de Sherman et collaborateurs démontrent le potentiel thérapeutique d'un ligand du VDR, le calcipotriol, qui entraîne une réduction de la fibrose dans des modèles murins de pancréatite aigüe, chronique, mais aussi d'ADK. Dans leur étude, la combinaison de cette molécule à la gemcitabine permet d'augmenter la survie de 57% en comparaison à la gemcitabine seule.

Le microenvironnement de l'ADK est le lieu de production de nombreuses cytokines agissant en faveur de la croissance tumorale et de la dissémination. Alors que le TGF- β et l'IL10 sont en faveur d'une tolérance immunitaire, l'IL6, l'IL1- β ou l'IL8 sont pro-inflammatoires et promeuvent la prolifération ainsi que la migration des cellules cancéreuses. Les travaux de Zhang et collaborateurs dans le modèle iKras combiné à la délétion de l'IL6

(*IL6^{fllox/fllox}*) démontrent la coopération entre la cytokine et Kras muté dans l'hyperactivation de la voie des MAPK et la voie JAK/STAT3 (Zhang et al. 2013). L'utilisation d'un anticorps monoclonal dirigé contre l'IL6 s'avère efficace et réduit considérablement l'étendue des lésions précancéreuses chez la souris.

L'implication de la voie JAK/STAT3 dans la rigidité de la fibrose est soutenue par de nombreux modèles murins. Les travaux de Laklai et collaborateurs démontrent que les souris exprimant Kras muté et une délétion du *Tgfr2* (KTC) présentent des tumeurs très fibreuses avec une forte expression de phospho-Stat3 (Laklai et al. 2016). En conséquence, la délétion supplémentaire de Stat3 (*Stat3^{fllox/fllox}*) dans ce modèle permet de diminuer la rigidité de la matrice et d'augmenter la survie. De plus, la génération d'un modèle combinant Kras muté et Stat3 constitutivement actif (*Stat3^{CA/+}*) entraîne une accélération de la tumorigenèse et une fibrose importante. Enfin, l'utilisation d'un anticorps monoclonal ciblant la kinase JAK (ruxolitinib) dans le modèle KTC entraîne une diminution de la rigidité matricielle, de l'inflammation et une augmentation de la survie.

Les modèles murins d'ADK sont devenus des outils inestimables pour les approches expérimentales visant à étudier la biologie de la tumeur et son microenvironnement. La génération de modèles exprimant Kras muté combiné à des pertes ou gains de fonction d'effecteurs candidats a permis de préciser le rôle de certaines voies moléculaires et de mettre en évidence de nouvelles cibles thérapeutiques. Si les études évoquées précédemment ont pour la plupart abouti à des essais chez l'Homme, aucune n'est aujourd'hui approuvée pour le traitement de l'ADK. De nombreux essais thérapeutiques sont cependant en cours, dont les plus informatifs seront évoqués dans la partie suivante.



Cible	Impact sur le développement de l'ADK	Référence
HH	L'inhibition pharmacologique de Smo (IPI-926) double la survie dans le modèle KPC	Olive et al. 2009
	La délétion de Shh (<i>Shh</i> ^{-/-}) dans le modèle KPC accélère le développement de l'ADK	Rhim et al. 2014
VDR	L'activation du VDR par le calcipotriol augmente l'efficacité de la gemcitabine dans le modèle KPC	Sherman et al. 2014
IL6	La perte de l'IL6 dans le modèle iKras diminue l'apparition de lésions	Zhang et al. 2013
JAK	L'inhibition de JAK (ruxolitinib) dans le modèle KTC bloque le remodelage de la matrice extra-cellulaire	Laklai et al. 2016
STAT3	L'expression de Stat3 (<i>Stat3C</i>) constitutivement actif accélère le développement de l'ADK dans le modèle KC	Laklai et al. 2016
	La perte de Stat3 (<i>Stat3</i> ^{-/-}) dans le modèle KTC augmente la survie et réduit la fibrose	Laklai et al. 2016

Figure 16 : Principales cibles thérapeutiques intervenant dans le remodelage du stroma tumoral

C. Les thérapies ciblées dans le traitement de l'ADK

A mesure que nos connaissances des bases moléculaires de l'ADK s'élargissent, les raisons des nombreux échecs ou modestes bénéfices en thérapies ciblées apparaissent de plus en plus évidents. En premier lieu, les interactions entre les voies de signalisation cellulaire sont complexes et très variables dans les ADK. Le ciblage d'un seul effecteur s'avère en conséquence souvent inefficace, tant les mécanismes de compensation sont nombreux. Par ailleurs, en dehors des mutations les plus répandues (KRAS, p16, p53, SMAD4) qui ne font pas l'objet d'un ciblage direct, la plupart ont une très faible prévalence. La stratification des patients sur une base moléculaire (Collisson et al. 2011; Moffitt et al. 2015; Waddell et al. 2015; P. Bailey et al. 2016) apparaît donc comme une stratégie de choix pour les futurs essais thérapeutiques. En revanche, l'identification de cibles se situant à des « carrefours » moléculaires doit être une priorité et constituer une approche complémentaire.

1. Ciblage de la cellule cancéreuse

Le développement de molécules inhibitrices de la GTPase KRAS s'est depuis toujours confronté à la difficulté de cibler sa poche catalytique, rendue inaccessible par sa forte affinité pour le GTP et l'abondance de ce dernier en intracellulaire. De nouvelles stratégies pharmacologiques ont cependant été développées, comme le ciblage de l'interaction PDEδ-KRAS (Zimmermann et al. 2013). La deltarasine est un inhibiteur de PDEδ qui empêche la localisation de KRAS à la membrane plasmique, et supprime l'activation de ERK. Le développement de molécules ciblant KRAS ne doit cependant pas faire oublier l'échappement à sa dépendance, décrit dans plusieurs modèles murins et confirmé chez l'humain dans les sous-types quasi-mésenchymateux et exocrine-like (Collisson et al. 2011).

En raison de la complexité du ciblage direct de KRAS, plusieurs inhibiteurs de MEK ont été évalués. Le trametinib, approuvé pour le traitement des mélanomes BRAF^{V600E} non-résécables en 2013 aux Etats-Unis, n'a démontré aucun bénéfice en phase II dans une cohorte non-stratifiée de 160 patients atteints d'un ADK métastatique, tout comme le pimasertib dans une cohorte de 88 patients (Infante et al. 2014; Van Cutsem et al. 2016).

Le ciblage de la kinase JAK par un anticorps monoclonal (ruxolitinib) a été évalué dans plusieurs essais. En phase II, la combinaison de la capecitabine au ruxolitinib en seconde ligne n'a pas démontré de bénéfice au regard de la survie globale. En revanche, après

stratification des patients sur la base d'une signature sérique inflammatoire (CRP entre autres), la combinaison démontre une amélioration de la survie à 6 mois (42% dans le groupe d'intérêt contre 11%) (Hurwitz et al. 2015). La combinaison capecitabine/ruxolitinib est actuellement évaluée en phase III dans 2 essais, alors que la faisabilité de la combinaison gemcitabine/ruxolitinib ou gemcitabine/nab-paclitaxel/ruxolitinib entame sa première phase.

Bien que la voie PI3K fasse l'objet de nombreuses études dans le contexte de l'ADK, aucun inhibiteur n'est en phase clinique avancée. L'implication majoritaire de l'isoforme p110 α soutenue par de récentes publications a cependant conduit à l'amorçage d'un essai visant à évaluer un inhibiteur isoforme-spécifique (BYL-719) en première ligne (**tableau 1**). En aval des PI3K et d'AKT, la kinase mTOR a en revanche fait l'objet de plusieurs essais de phase II. Le sirolimus et l'everolimus, deux inhibiteurs allostériques de la kinase mTOR, n'ont démontré aucun effet bénéfique dans 2 essais incluant 31 et 33 patients (Garrido-Laguna et al. 2010; Wolpin et al. 2009). Le manque d'efficacité de ces inhibiteurs peut s'expliquer par leur incapacité à altérer l'effet pro-prolifératif de mTOR. En effet, la kinase mTOR stimule la prolifération cellulaire en phosphorylant les inhibiteurs traductionnels 4E-BPs qui sont alors incapables de bloquer la synthèse protéique (R. J. Dowling et al. 2010). Si les inhibiteurs catalytiques de mTOR récemment développés parviennent à causer une déphosphorylation complète des 4E-BPs, les analogues de la rapamycine utilisés en essais thérapeutiques s'avèrent inappropriés.

2. Ciblage du stroma

Le dialogue entre la cellule cancéreuse et son stroma demeure la cible de nombreuses molécules en développement. Si l'échec en phase clinique de l'inhibiteur de Smo (IPI-926) a mis en lumière la complexité de cette approche, le développement de nouvelles molécules démontre que le microenvironnement peut être ciblé différemment.

La PEGPH20 est une hyaluronidase recombinante actuellement évaluée en phase II, combinée à la gemcitabine et au *nab*-paclitaxel, ou au FOLFIRINOX (**tableau 1**). La hyaluronidase permet de dégrader l'acide hyaluronique entrant dans la composition du stroma et améliore la diffusion de la gemcitabine dans le modèle KPC, allant jusqu'à doubler la survie des animaux (Provenzano et al. 2012).

3. Immunothérapie

Le microenvironnement de l'ADK est caractérisé par son caractère immunosuppresseur. Différents types cellulaires sont impliqués, notamment les fibroblastes associés au cancer (CAF), les cellules myéloïdes suppressives (MDSC) ou les macrophages associés aux tumeurs (TAM). Interférer avec la fonction de ces médiateurs pourraient permettre de rétablir un environnement permissif pour l'immunité anti-tumorale.

Utilisées pour la première fois contre les cellules CD19 positives dans la leucémie lymphoïde aigüe, les cellules T exprimant un récepteur antigénique chimérique (CAR-T) pourraient s'avérer prometteuses dans le traitement de l'ADK (**tableau 1**). Les travaux de Stromnes et collaborateurs réalisés dans le modèle KPC démontrent que l'administration de cellules CAR-T exprimant un récepteur à la mésothéline modifié permet de doubler la survie des animaux (Stromnes et al. 2015). L'évaluation des cellules CAR-T dans le traitement de l'ADK est actuellement en phase I pour les stades métastatiques et pourrait bénéficier de la récente classification établie par Bailey et collaborateurs (P. Bailey et al. 2016).

Molécule	Mécanisme d'action	Mode de traitement	Phase
En combinaison avec gemcitabine/nab-paclitaxel			
BYL719	Inhibiteur de p110 α	1ère ligne	I
Indoximod (D-1MT)	Inhibiteur de l'indoléamine-2,3-dioxygénase	1ère ligne	I/II
Vismodegib (GDC-0449)	Inhibiteur de la voie Hedgehog	1ère ligne	II
Momelotinib (GS-0387)	Inhibiteur de JAK	1ère ligne	II
PEGPH20	Hyaluronidase recombinante humaine	1ère ligne	II
INCB039110	Inhibiteur de JAK1	2nde ligne	Ib
Sans association de chimiothérapie			
CAR-T Meso	Cellules T autologues exprimant un récepteur à la mésothéline modifié	2nde ligne	I
Rucaparib	Inhibiteur de PARP (patients mutés <i>BRCA</i>)	2nde ligne	II

Tableau 1 : Récents essais cliniques de thérapie ciblée déployés pour le traitement de l'ADK

Adapté de Garrido-Laguna et al. 2015

Les approches génomiques à grande échelle ainsi que les cribles génétiques chez l'animal ont permis de décrire les voies moléculaires intervenant dans le développement de l'ADK, et de préciser leur niveau d'implication. La mise en évidence de médiateurs « ciblables » , nécessitant l'utilisation de modèles génétiques, a permis d'aboutir à de nombreux essais thérapeutiques chez l'Homme. Les différences d'efficacité existant entre les études précliniques et cliniques rappellent cependant la nécessité d'un choix de population. Si les études précliniques n'utilisent généralement qu'un modèle murin, les récentes approches génomiques portant sur de larges cohortes de patients révèlent l'existence de nombreux sous-types moléculaires (P. Bailey et al. 2016; Collisson et al. 2011; Moffitt et al. 2015; Waddell et al. 2015).

Etonnamment, les essais effectués jusqu'à présent n'avaient que rarement tenu compte d'une quelconque stratification. Il semblerait cependant que de nouveaux travaux amorcent une nouvelle ère dans la prise en charge de l'ADK, tels que l'essai IMPaCT initié par l'ICGC (Chantrill et al. 2015). En dépit des nombreuses découvertes évoquées précédemment, le constat demeure inchangé : aucune molécule n'a à ce jour permis de traiter efficacement l'ADK. La recherche de nouvelles cibles doit donc rester une priorité, sans omettre de tenir compte des biais ayant abouti à des échecs thérapeutiques.

CHAPITRE 3 : LA TRADUCTION ET SON IMPLICATION

EN CANCEROLOGIE

La synthèse protéique, ou traduction des ARNm, est le processus le plus consommateur en énergie de la cellule, où elle joue un rôle crucial dans l'expression génique. De récentes études démontrent en effet que le transcriptome cellulaire n'est que partiellement corrélé au protéome, conférant à la traduction une importance majeure dans le contrôle spatial et temporel de l'expression des gènes (Schwanhäusser et al. 2011; Ghazalpour et al. 2011). Le contrôle traductionnel constitue ainsi la réponse la plus rapide aux changements environnementaux, par la mise en jeu de mécanismes intervenant essentiellement au niveau de son initiation.

La première observation faisant état d'une dérégulation de la traduction dans les cancers remonte à 1896, quand les pathologistes Pianese et Teuscher décrivirent une croissance aberrante du lieu de production des ribosomes, ou « hypertrophie nucléolaire », vraisemblablement caractéristique des cellules cancéreuses. Cette implication est aujourd'hui largement renforcée, comme en témoignent l'amplification et la dérégulation de nombreux facteurs de l'initiation dans les tumeurs humaines.

La majorité des mutations retrouvées dans les cancers interviennent dans des voies de signalisation se situant en amont de la traduction. Ainsi de nombreux oncogènes ou suppresseurs de tumeurs ont une influence directe sur le contrôle traductionnel. Cette situation à un véritable point de convergence de voies de signalisation oncogéniques souligne l'importance de développer des moyens efficaces de cibler l'initiation de la traduction dans les cancers.

Si la cellule cancéreuse présente une synthèse protéique globalement élevée, il semblerait pourtant que la diversité des phénotypes cancéreux soit causée par une traduction sélective de groupes d'ARNm. Les méthodes d'analyse développées très récemment ont permis de comprendre les mécanismes responsables de cette traduction « spécialisée » et de mettre en évidence des processus propres à certains cancers, susceptibles de faire l'objet d'un ciblage thérapeutique.

A. Vue d'ensemble de la traduction chez les eucaryotes supérieurs

Une caractéristique notable des ARNm cytoplasmiques chez les mammifères est la présence d'une coiffe (guanosine méthylée en position N7) située en 5', ajoutée à l'ARNm naissant peu après l'initiation de sa transcription. Le recrutement du ribosome par l'intermédiaire de cette coiffe représente le mode d'initiation majoritaire de la traduction des ARNm, et vraisemblablement le plus efficace (Both et al. 1975). Dans de nombreux ARNm viraux non coiffés, la présence d'IRES (site d'entrée interne du ribosome) constitue un mécanisme alternatif d'initiation. Ces structures sont par ailleurs retrouvées dans des ARNm coiffés, où elles permettent l'initiation de la traduction dans des conditions de stress, ou comme plus récemment démontré, dans les phases précoces du développement embryonnaire (S. Xue et al. 2015). Par souci de concision et de cohérence avec mes travaux de thèse, seuls seront abordés les mécanismes régulant l'initiation cap-dépendante de la traduction.

1. L'initiation de la traduction comme étape critique

L'initiation est l'étape de la traduction la plus finement régulée (Sonenberg and Hinnebusch 2009). Cette phase requiert la coordination de nombreux points de contrôle par les facteurs de l'initiation qui déterminent l'efficacité de traduction des ARNm, et donc l'abondance relative des protéines.

1.1. eIF4F et le recrutement du ribosome

Si la coiffe des ARNm est impliquée dans de nombreux processus tels que l'épissage, la polyadénylation ou la stabilité, sa fonction la plus remarquable implique le recrutement du complexe de préinitiation 43S sur la matrice ribonucléique par l'intermédiaire du complexe eIF4F (Muthukrishnan et al. 1975).

eIF4F est un complexe hétérotrimérique composé de la protéine de liaison à la coiffe eIF4E, de l'hélicase eIF4A et de la protéine d'échafaudage eIF4G, qui interagit avec eIF4E et eIF4A. Ainsi le recrutement du complexe de préinitiation 43S (PIC) est facilité par eIF4F au travers de sa liaison à la coiffe (eIF4E), de sa capacité à dérouler les structures secondaires de l'ARN (eIF4A), et de l'interaction stabilisatrice eIF4G-eIF3.

Une fois lié à l'ARNm, le complexe de préinitiation 43S (PIC) contenant l'ARNt initiateur et les eIFs 1, 1A, 2, 3, 5, procède à l'identification du codon « start » par un mécanisme de « balayage » de la matrice, à la recherche d'une complémentarité avec l'anticodon de l'ARNt initiateur. Lorsqu'une correspondance est trouvée, l'appariement du codon AUG avec l'ARNt initiateur a lieu au niveau du site P (peptidyl) du ribosome. Le balayage est alors arrêté, provoquant l'hydrolyse du GTP au sein du complexe ternaire eIF2-GTP-ARNt initiateur (TC), qui permettait la liaison au PIC. La libération de l'eIF2 et des autres eIFs permet à la sous-unité 60S ribosomique de s'attacher à la 40s et de former le complexe 80S. Le transfert de l'ARNt au site A permet ainsi la synthèse de la première liaison peptidique (**figure 17**) (Sonenberg and Hinnebusch 2009).

1.2. De l'élongation à la réinitiation

Durant la phase d'élongation, le ribosome et ses facteurs d'élongation (eEFs) se déplacent le long de la région codante de l'ARNm et synthétisent le polypeptide. L'abondance de la protéine résultante sera d'autant plus importante qu'il y a de ribosomes traduisant simultanément l'ARNm (polysomes). Au niveau du codon STOP, le peptide est libéré par les eRFs (eukaryotic releasing factors) qui procèdent en parallèle à la dissociation des ribosomes, tandis que certains complexes ribosomiques serviront à une réinitiation de la traduction.

Si les facteurs facilitant la réinitiation demeurent peu étudiés, il semblerait que la conformation en boucle fermée (closed-loop) de l'ARNm soit permissive. La capacité de la PABP (poly-A binding protein) à interagir avec eIF4G permet en effet le rapprochement de la coiffe à la queue polyA, et la circularisation de l'ARNm. Si l'interaction PABP-eIF4G permet une conformation optimale de l'ARNm, il semblerait que la régulation de la traduction soit principalement opérée par des partenaires et compétiteurs de la PABP. La protéine Paip1 (PABP-interacting protein 1), en interagissant avec eIF3, permet une stimulation de la traduction alors que son homologue Paip2 entraîne une dissociation de l'association PABP-eIF4G (Martineau et al. 2008; Karim et al. 2006). Les travaux de Svitkin et collaborateurs décrivent un nouveau compétiteur de la PABP, hnRNP-Q2, dont la surexpression entraîne une dissociation du complexe d'initiation et l'arrêt de la traduction (Yuri V. Svitkin et al. 2013). Il semblerait donc que la clef de la réinitiation réside dans l'interaction entre la queue polyA et la coiffe des ARNm.

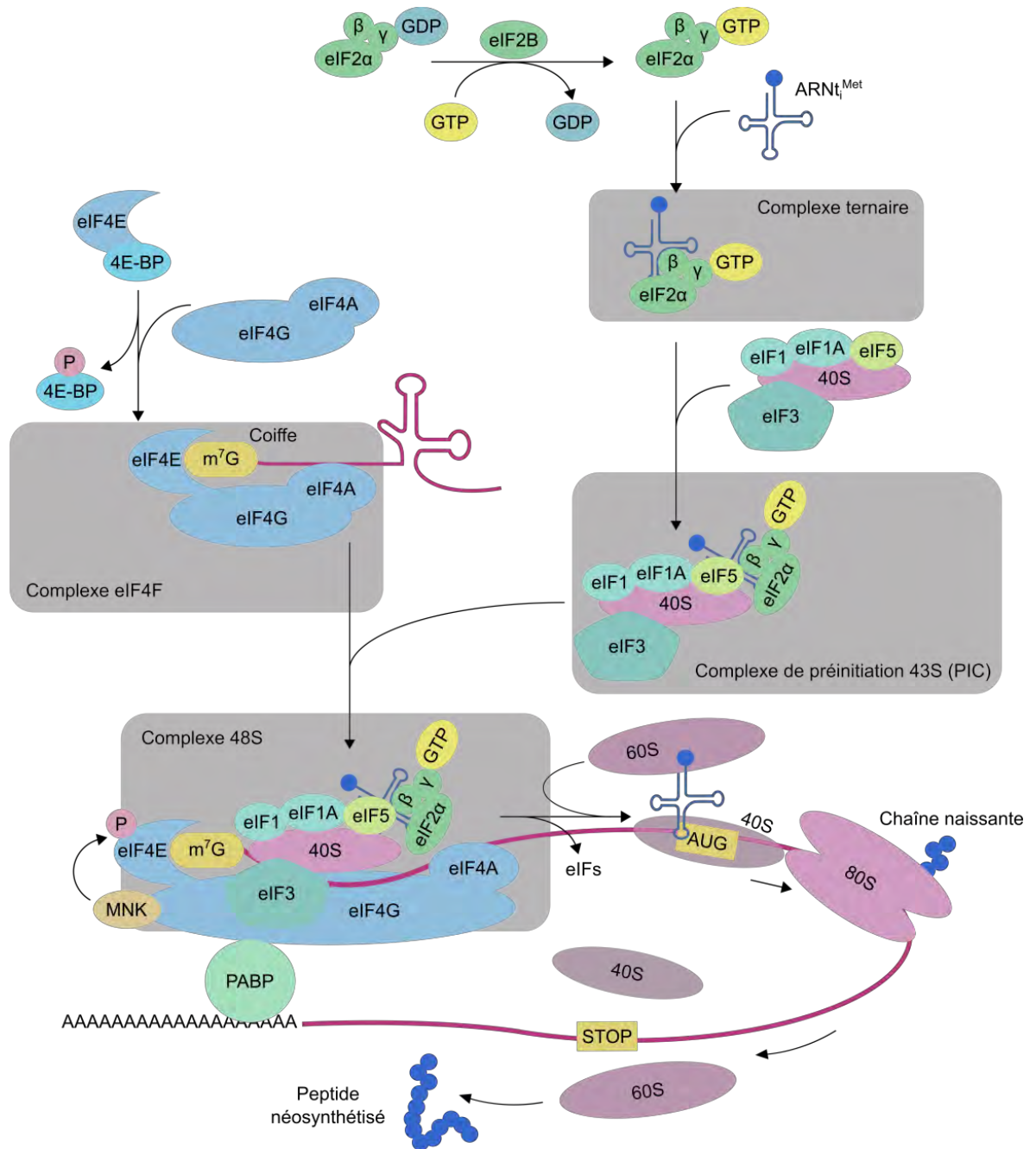


Figure 17 : L'initiation de la traduction cap-dépendante

Les 2 phases critiques déterminant l'initiation de la traduction sont l'association de la sous-unité 40S avec ses partenaires pour former le complexe 43S (PIC), et l'accès du complexe à la matrice d'ARN. Le recrutement du PIC à l'ARN est facilité par le complexe eIF4F composé de la protéine de liaison à la coiffe eIF4E, de la protéine d'échafaudage eIF4G et de l'ARN hélicase eIF4A. L'interaction d'eIF4E avec la coiffe et d'eIF4G avec eIF3 facilite le recrutement de la 43S pour former le PIC 48S. eIF4G interagit aussi avec la PABP (poly(A)-binding protein) associée à la queue, et entraîne la circularisation de l'ARN. eIF4A facilite le balayage de la matrice par le ribosome en déroulant les structures secondaires présentes dans la région non-codante (5'UTR). La reconnaissance du codon initiateur AUG par le PIC entraîne la libération des eIFs et le recrutement de la sous-unité 60S. La formation du complexe ribosomique 80S marque la fin de l'initiation et le début de l'élongation. Adapté de Bhat et al. 2015.

2. Régulation de la traduction par mTOR

L'un des premiers indices reliant la kinase mTOR à l'initiation de la traduction fut l'observation par Pause et collaborateurs que l'insuline stimule la synthèse protéique en causant une phosphorylation des 4E-BPs, favorisant ainsi la formation du complexe eIF4F (Pause et al. 1994). Si l'identification de la protéine mTOR venait d'être réalisée (Sabatini et al. 1994), sa fonction kinase ne sera mise en évidence qu'une année plus tard (Sabatini et al. 1995). Enfin, son lien direct avec la traduction sera révélé par sa capacité à phosphoryler les 4E-BPs (Brunn et al. 1997), puis les S6Ks (Burnett et al. 1998).

La sérine/thréonine kinase mTOR (mammalian target of rapamycin) existe au sein de deux complexes : mTOR complex 1 (mTORC1) et mTORC2. Alors que le complexe mTORC1 affecte la prolifération cellulaire, la croissance, le métabolisme et l'autophagie, mTORC2 active les kinases SGK1 et AKT, toutes deux impliquées dans la survie cellulaire, et régule l'organisation du cytosquelette.

mTORC1 est le complexe le mieux caractérisé et présente la particularité d'intégrer un nombre considérable de signaux intra et extracellulaires. Les facteurs de croissance, les signaux de stress, le statut énergétique cellulaire, l'oxygène et les acides aminés constituent autant de facteurs capables de modifier la synthèse protéique, lipidique, et l'autophagie au travers de l'action du complexe mTORC1 (Laplante and Sabatini 2012).

Les facteurs de croissance et les hormones, tels que l'EGF (epidermal growth factor) ou l'insuline, stimulent l'activité de mTORC1 par l'intermédiaire des récepteurs à activité tyrosine kinase (RTKs) et le relais en aval des voies PI3K et MAPK. Ces dernières activent mTORC1 en inhibant le complexe TSC1/2 (tuberous sclerosis complex 1/2). Le complexe TSC est un régulateur négatif de mTORC1 jouant un rôle de GAP (GTPase-activating protein) pour Rheb et qui permet le maintien de cette dernière dans une conformation inactive. Lors d'une stimulation par des facteurs de croissance, la forme activée de Rheb s'accumule et active mTORC1 par une interaction directe (Inoki et al. 2003).

D'autres facteurs modulant l'activité du complexe sont directement intégrés par TSC1/2, tels que l'hypoxie ou les dommages à l'ADN. En réponse à l'hypoxie, l'AMPK (adénosine monophosphate-activated protein kinase) phosphoryle TSC2 et augmente son activité de GAP. Les dommages à l'ADN, via la transcription de p53, induisent l'expression

de *TSC2* et de *PTEN*, causant une inhibition globale de l'axe PI3K-mTORC1 (Feng et al. 2005).

L'activité de mTORC1 est aussi sensible à la présence de nutriments, en particulier aux acides aminés tels que la leucine, l'arginine et la glutamine. Cette régulation par les acides aminés implique de nombreux événements conduisant à l'activation des GTPases Rag. Les Rag, une fois activées, interagissent avec Raptor au sein de mTORC1 et recrutent le complexe au lysosome où réside l'activateur Rheb (Sancak et al. 2010).

Si mTORC1 est désormais décrit comme un régulateur de la synthèse lipidique, de l'autophagie, ou encore du métabolisme oxydatif, son implication dans le contrôle de la synthèse protéique demeure de loin la mieux étudiée. Sa phosphorylation directe des 4E-BPs empêche leur interaction avec eIF4E et facilite la formation du complexe eIF4F, requise pour l'initiation de la traduction. Son activation des S6Ks favorise quant à elle l'initiation mais aussi l'élongation de la traduction.

2.1. Les S6Ks

Les S6Ks sont des sérine/thréonine kinases régulant de nombreux effecteurs impliqués dans le contrôle de la traduction, afin de favoriser son déroulement. Au niveau de l'initiation, l'activité de l'hélicase eIF4A est favorisée par la phosphorylation activatrice du facteur de processivité eIF4B, alors que celle de PDCD4 entraîne la dégradation de ce régulateur négatif de l'hélicase. Par ailleurs, les S6Ks régulent l'élongation en inactivant la kinase eEF2K, un régulateur négatif du facteur eEF2, essentiel à la translocation du peptide du site A au site P du ribosome (X. Wang et al. 2001) (**figure 18**).

Son substrat le plus remarquable et le plus anciennement identifié est la protéine ribosomique S6 (rpS6), un composant de la sous-unité ribosomique 40S. Si sa phosphorylation est retrouvée dans les polysomes, elle ne semble néanmoins pas essentielle puisque leur formation n'est pas affectée dans les cellules issues de souris *rpS6^{P-/-}* (Ruvinsky et al. 2005). Ces animaux présentent par ailleurs une réduction notable des cellules β , ainsi qu'une hypoinsulinémie et une intolérance au glucose, rappelant le phénotype des souris *S6K1^{-/-}*, qui présentent pourtant un niveau normal de phosphorylation de rpS6, compensé par S6K2 (Pende et al. 2000). Si ces résultats suggèrent un mécanisme complexe de régulation par les S6Ks, les données de Dowling et collaborateurs confirment qu'elles sont les médiateurs de mTORC1 sur la croissance cellulaire (Dowling et al. 2010). Les travaux de

Ohanna et collaborateurs parviennent à la même conclusion puisque la délétion de *S6K1* dans les myoblastes murins entraîne une réduction de la taille cellulaire, comparable à l'effet de la rapamycine, un inhibiteur allostérique de mTOR (Ohanna et al. 2005).

2.2. Les 4E-BPs

Le clonage de 4E-BP1 et 4E-BP2 par Pause et collaborateurs leur permit très rapidement d'identifier leur rôle de répresseur traductionnel (Pause et al. 1994). Si l'identification de la fonction kinase de mTOR fut réalisée par un autre groupe, les auteurs démontrèrent néanmoins que les 4E-BPs étaient phosphorylées en réponse à l'insuline, entraînant une libération d'eIF4E et la formation du complexe eIF4F (**figure 18**). Au vu du potentiel oncogénique d'eIF4E récemment mis en évidence, cette découverte laissait déjà présager d'un potentiel rôle suppresseur de tumeur pour ces inhibiteurs de la traduction (Lazaris-Karatzas, Montine, and Sonenberg 1990).

Sur les 3 loci codant pour les 4E-BPs, ceux codant pour 4E-BP1 et 4E-BP2 présentent la plus forte homologie et demeurent les plus étudiés, notamment car ces deux protéines sont régulées de manière identique. Sur les 7 sites de phosphorylation que comprennent ces 4E-BPs (1 et 2), 4 s'avèrent déterminant pour la liaison à eIF4E et l'inhibition de la traduction. Dans un premier temps, la phosphorylation des résidus T37 et T46 se révèle permissive pour la phosphorylation suivante, aux résidus S70 et S65. Ce dernier événement va permettre la libération d'eIF4E et la liaison à eIF4G en lieu et place des 4E-BPs (Gingras et al. 2001).

La présence du motif TOS (mTOR signaling motif) sur les 4E-BPs, requis pour la liaison à l'adaptateur Raptor, suggère que mTOR est leur kinase majoritaire. Cette séquence située en C-terminal, ainsi que le motif RAIP présent en N-terminal, sont nécessaires à la phosphorylation efficace des résidus conditionnant la libération d'eIF4E (Choi, McMahon, and Lawrence 2003).

La contribution exacte des 4E-BPs aux effets cellulaires de mTOR demeure imprécise jusqu'aux travaux de Dowling et collaborateurs, basés sur l'utilisation de cellules issues de souris déficientes pour les 4E-BP 1 et 2 (DKO) (Dowling et al. 2010). Ce modèle cellulaire révèle que l'inhibition de la kinase mTOR par des inhibiteurs catalytiques (PP242 et Torin1) entraîne une réduction de la prolifération, alors que la délétion des 4E-BPs annule cet effet. La croissance cellulaire n'est quant à elle aucunement affectée, démontrant que les S6Ks régulent

ce processus. Les auteurs révèlent ainsi un découplage de la régulation de la prolifération et de la croissance cellulaire en aval de mTOR, un trait unique des eucaryotes supérieurs.

Ainsi l'inhibition de la kinase mTOR permet l'activation des 4E-BPs, qui sont capables de réprimer la prolifération en diminuant spécifiquement la traduction d'ARNm impliqués dans ce processus, tels que la cycline D3, ODC (ornithine decarboxylase) ou le VEGF. Ces données sont d'une importance majeure pour la compréhension des mécanismes sous-jacents à la dérégulation de mTOR, récurrente dans les cancers (Sabatini 2006). Elles soulignent d'une part le potentiel anti-oncogénique des 4E-BPs, mais aussi la possibilité que des ARNm particuliers voient leur traduction modulée par l'activité de mTOR, au dépens des 4E-BPs.

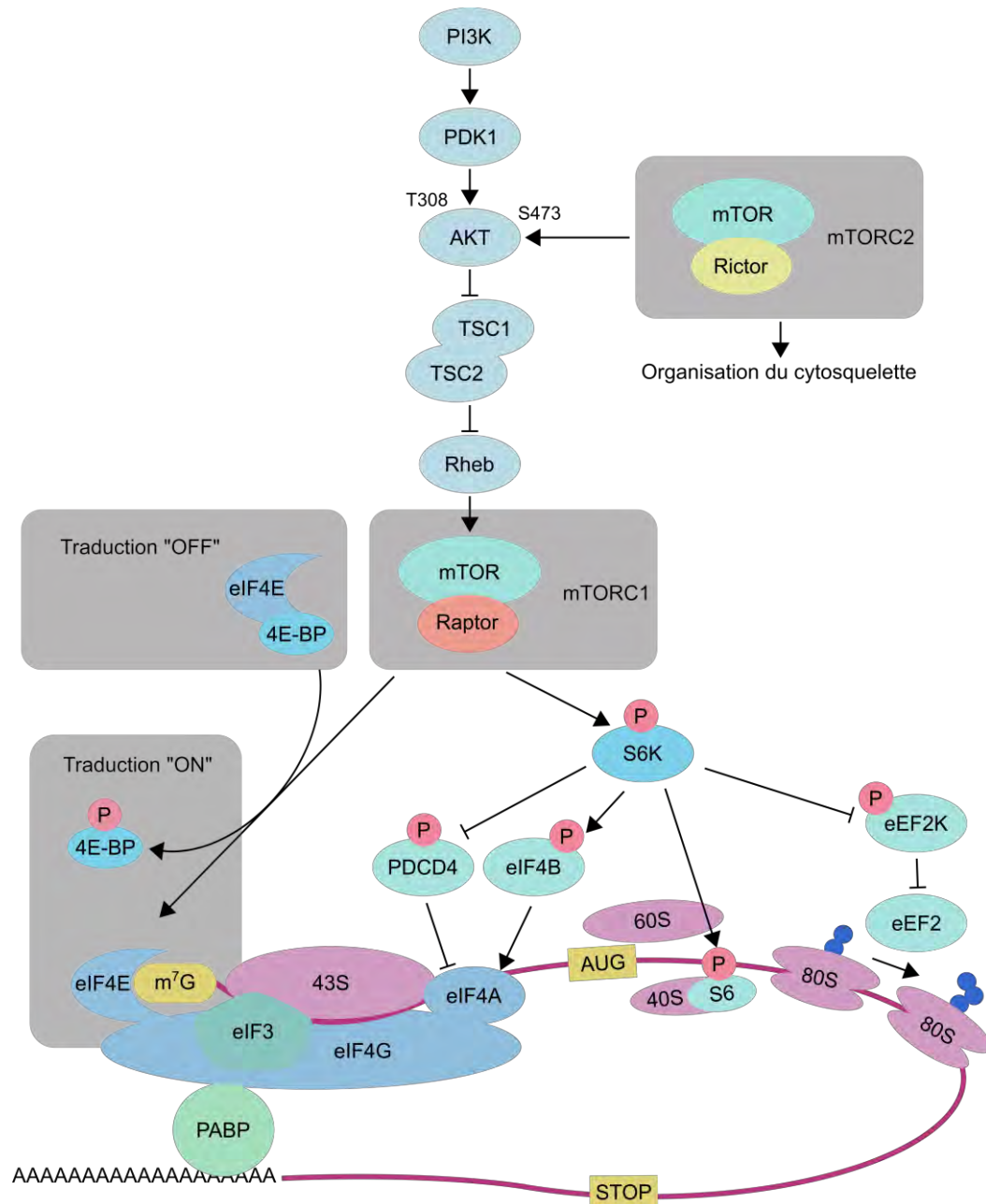


Figure 18 : Régulation de la traduction par mTOR

La voie PI3K est activée en réponse à de nombreux stimuli extracellulaires, et aboutit à l'activation de la sérine/thréonine kinase mTOR. Son association à de multiples facteurs conditionne la formation des complexes mTORC1 et mTORC2, impliqués dans des fonctions subcellulaires différentes. mTORC1 phosphoryle les 4E-BPs, entraînant leur dissociation d'eIF4E et sa mise à disposition pour former le complexe eIF4F (traduction ON). En cas d'inhibition de mTOR, les 4E-BPs sont déphosphorylées et séquestrent eIF4E, entraînant une inhibition de la traduction (traduction OFF). La phosphorylation des S6Ks par mTORC1 entraîne leur activation et la phosphorylation de leurs effecteurs. La phosphorylation de PDCD4 et d'eEF2K sont inactivatrices et permettent respectivement l'activation d'eIF4A et d'eEF2. La phosphorylation d'eIF4B est activatrice et stimule l'activité hélicase d'eIF4A. Le complexe mTORC2 est quant à lui impliqué dans la croissance cellulaire, via la régulation du cytosquelette.

B. Contribution de la traduction au développement des cancers

Le lien entre l'étiologie des cancers et la perturbation du contrôle traductionnel devient de plus en plus évident et fait l'objet de nombreux travaux. Ceux-ci tendent à prouver que le contrôle de la traduction est « détourné » par les voies de signalisation oncogéniques au cours de la transformation tumorale, afin de favoriser croissance cellulaire, prolifération, survie et invasion. Dans la cellule saine, ces voies moléculaires possèdent des fonctions de senseurs d'énergie et de stress, et modulent ainsi la réponse aux stimuli extérieurs par le biais du contrôle traductionnel. Dans les cancers, ces voies sont activées de manière permanente et promeuvent le développement tumoral. Une conséquence de cette signalisation aberrante est l'altération de l'activité et de l'expression de nombreux facteurs de l'initiation (**tableau 2**). Ces événements peuvent être responsables d'une augmentation globale de la synthèse protéique, mais aussi d'une traduction sélective de messagers essentiels à la croissance tumorale.

Facteur	Dérégulation	Corrélation clinique en cancérologie
eIF4E	Surexpression	Mauvais pronostic : sein, tête et cou, foie, prostate, vessie, estomac
eIF4E	Phosphorylation	Elevé aux stades précoces : sein, colon, poumon Mauvais pronostic : NSCLC
4E-BP1	Surexpression	Corrélation inverse du grade tumoral Bon pronostic : poumon, prostate
4E-BP1	Perte d'expression	Perte du contrôle traductionnel : PDAC (50%)
4E-BP1	Phosphorylation	Corrélation au grade tumoral : sein, poumon, ovaire, prostate
eIF4G	Surexpression	Amplification : poumon Surexprimé : sein, utérus
eIF4A	Surexpression	Poumon et utérus Utérus : diminution de l'expression associée à meilleure survie post-irradiation
eIF6	Altération	Colon, tête et cou : surexpression Ovaire : expression diminuée associée à une moins bonne survie sans progression
eIF3 (a, b, c, h, i, m)	Surexpression	Sein, utérus, poumon, estomac, vessie, prostate, colon, foie, mélanome
eIF3 (e, f)	Diminution expression	Sein, poumon, prostate, colon, ovaire, mélanome

Tableau 2 : Facteurs d'initiation de la traduction altérés dans les cancers.

Adapté de Bhat et al. 2015.

1. Altérations des facteurs de la traduction dans les cancers

1.1. La voie PI3K et les 4E-BPs

Parmi les signaux oncogéniques régulant l'initiation de la traduction, la voie PI3K-AKT-mTOR est probablement la mieux caractérisée, du fait de son altération récurrente dans les cancers. La kinase mTOR constitue son médiateur direct sur la traduction au travers de la phosphorylation des S6Ks et des 4E-BPs. Une fois phosphorylées, ces dernières libèrent eIF4E qui retrouve alors sa capacité à recruter les autres eIFs nécessaires au recrutement du ribosome et à l'initiation de la traduction (Pause et al. 1994). Cette inactivation des 4E-BPs est en adéquation avec le besoin de la cellule cancéreuse de maintenir un niveau élevé de synthèse protéique.

De nombreux travaux suggèrent ainsi que ces répresseurs traductionnels possèdent des propriétés anti-oncogéniques (Martineau et al. 2013). Les travaux de Petroulakis et collaborateurs démontrent grâce à l'utilisation d'un modèle murin déficient pour les 4E-BPs que leur perte d'expression accélère la tumorigenèse causée par la perte de p53 (Petroulakis et al. 2009). Ces données révèlent que les 4E-BPs, lorsqu'elles sont exprimées, constituent un « frein » à la prolifération engendrée par la perte de p53.

Les données d'Avdulov et collaborateurs dans des lignées cancéreuses mammaires décrivent une inactivation constitutive des 4E-BPs par phosphorylation dans ces cellules, favorisant l'assemblage du complexe eIF4F (Avdulov et al. 2004). L'introduction de mutants non-phosphorylables des 4E-BPs (constitutivement actifs) dans ces mêmes lignées inhibe le développement tumoral de xénogreffes en stimulant l'apoptose.

Dans un modèle murin de lymphome, les données de Hsieh et collaborateurs démontrent que l'expression de cette même forme non-phosphorylable de 4E-BP1 ralentit la croissance tumorale causée par l'activation constitutive d'Akt (Hsieh et al. 2010). Dans cette même étude, l'expression d'une forme non-phosphorylable de la protéine S6 ne modifie pas la cinétique d'évolution des tumeurs, soulignant le rôle capital de l'activation du complexe eIF4F dans le développement tumoral, favorisé par l'inactivation des 4E-BPs.

Le potentiel anti-oncogénique des 4E-BPs est donc supporté par de nombreuses études, bien que leur profil ne corresponde pas à la description du suppresseur de tumeur « classique ». La délétion de 4E-BP1 et 4E-BP2 chez la souris n'entraîne d'ailleurs aucune

formation de tumeurs, contrairement à la délétion de p53 qui entraîne la formation spontanée de lymphomes et sarcomes (Le Bacquer et al. 2007).

Ainsi l'inactivation ou la perte d'expression des 4E-BPs confère un avantage prolifératif significatif aux cellules cancéreuses, notamment dans les tumeurs présentant une hyperactivation des voies situées en amont (Mallya et al. 2014; Martineau, Azar, Bousquet, et al. 2013). Il semblerait donc que les 4E-BPs soient des suppresseurs de tumeurs particuliers, dont le rôle s'avère déterminant lors de la perte d'un premier suppresseur de tumeur (Petroulakis et al. 2009) ou lors de l'activation des voies oncogéniques (She et al. 2010).

1.2. La voie des MAPK et la phosphorylation d'eIF4E

L'activité du complexe eIF4F peut aussi être régulée par la voie des MAPK, au travers de la phosphorylation d'eIF4E par les MNK (**figure 19**) (Pyronnet et al. 1999). Cette phosphorylation, dont le rôle demeure sujet à controverse, semble toutefois largement contribuer à son potentiel oncogénique (Proud 2015). Les travaux de Wendel et collaborateurs dans un modèle de transfert adoptif chez la souris Eμ-Myc révèlent que l'expression d'un mutant d'eIF4E non-phosphorylable (S209A) ralentit la tumorigenèse, alors que la surexpression de sa kinase Mnk1 l'accélère (Wendel et al. 2007). Selon les auteurs, la phosphorylation d'eIF4E permet d'augmenter la traduction du message du facteur anti-apoptotique Mcl-1, contribuant ainsi à la survie cellulaire.

L'utilisation d'un modèle génétique mutant pour le site de phosphorylation d'eIF4E (*Eif4e*^{S209A/S209A}) révèle une résistance à la transformation opérée par Ras (Furic et al. 2010). Par ailleurs, la combinaison à un modèle murin de cancer prostatique (*Pten*^{flx/flx}) révèle que l'absence de phosphorylation d'eIF4E empêche l'évolution des lésions vers le stade infiltrant. Parmi les cibles traductionnelles incriminées, les auteurs mettent en évidence MMP3, dont la synthèse est favorisée par la forme phosphorylée d'eIF4E, et dont l'expression est corrélée à un mauvais pronostic chez les patients atteints de carcinome prostatique.

Ce rôle pro-oncogénique est finalement confirmé par les données de Ueda et collaborateurs démontrant que l'inactivation génétiques des kinases d'eIF4E, MNK1 et MNK2, retarde la croissance tumorale dans un modèle murin de lymphome (Ueda et al. 2010).

Au-delà de la régulation directe du facteur eIF4E, la voie des MAPK joue un rôle prépondérant dans la régulation de la kinase mTOR, directement ou par l'intermédiaire de la voie PI3K avec laquelle elle entretient un dialogue permanent (**figure 19**). Au plus haut de la

voie, la forme active de RAS (RAS-GTP) est capable d'activer de manière allostérique les PI3K. Une forte activation de la voie des MAPK conduit par ailleurs à une répression du complexe TSC1/2 par ERK et RSK, favorisant l'activation de mTORC1. Les kinases ERK et RSK peuvent aussi stimuler l'activité du complexe en phosphorylant directement la sous-unité RAPTOR entraînant, comme les événements précédents, à une phosphorylation des 4E-BPs (Carriere et al. 2011).

Le complexe mTORC1 constitue donc un point de convergence des voies oncogéniques PI3K et MAPK, intègre leur signaux et les relaie sur l'initiation de la traduction (She et al. 2010; Armengol et al. 2007). L'activation différentielle de ces voies dicte vraisemblablement un comportement propre à chaque cancer, au travers de la traduction sélective d'ARNm impliqués dans des processus favorables à la progression tumorale.

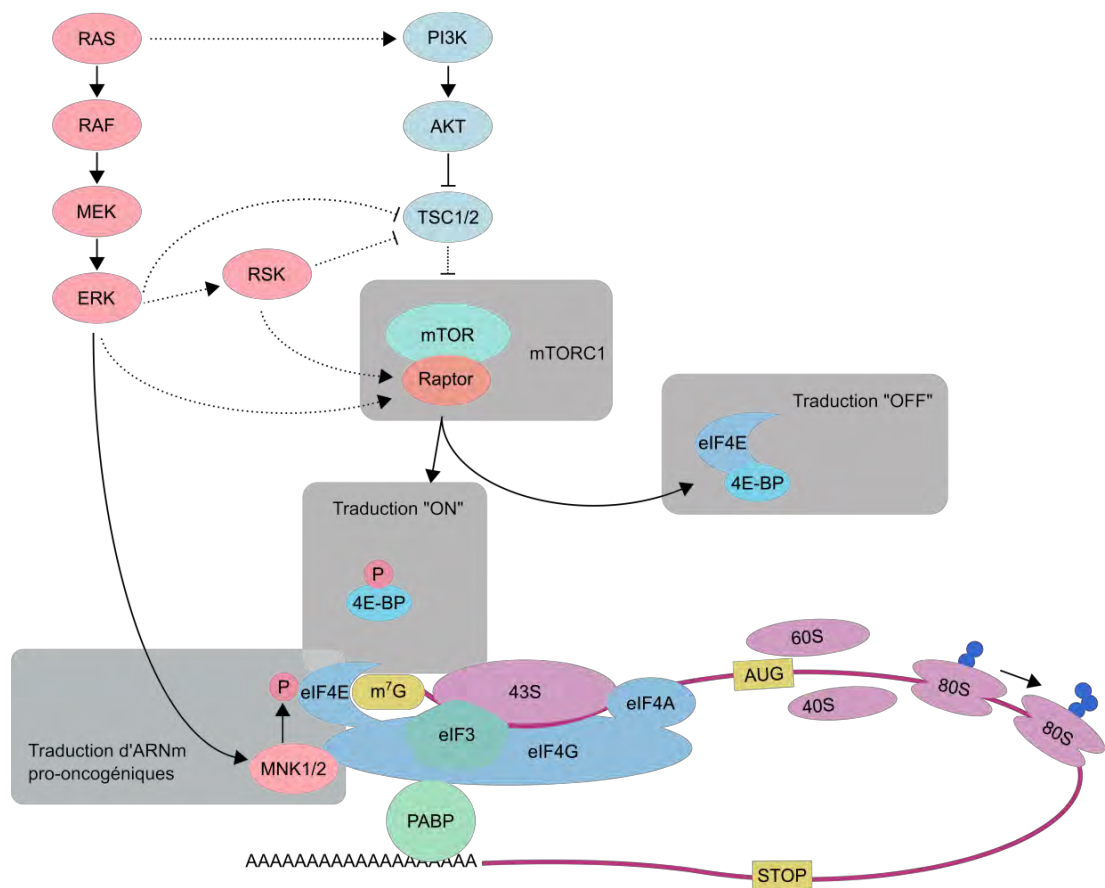


Figure 19 : La phosphorylation d'eIF4E et la voie des MAPK

L'activation oncogénique des voies de signalisation peut stimuler la traduction de messagers pro-oncogéniques de deux manières. Le complexe mTORC1 phosphoryle les répresseurs traductionnels 4E-BPs, permettant la formation du complexe eIF4F. D'autre part, la voie des MAPK initiée par l'oncogène RAS active les MNK qui phosphorylent eIF4E sur la serine209, et engendrent la traduction de messagers pro-tumorigènes. La voie des MAPK peut participer à l'activation du complexe mTORC1 via RAS, ERK ou RSK. RAS stimule directement les PI3K alors que ERK et RSK inhibent le complexe TSC1/2 et activent directement RAPTOR.

2. La traduction sélective et le traductome des cancers

La première preuve de l'existence d'une traduction sélective des ARNm vient de l'observation par Pelletier et Sonenberg que l'insertion de structures complexes en 5'UTR empêche son bon déroulement (Pelletier and Sonenberg 1985). Des études ultérieures révéleront que la surexpression d'eIF4E suffit à surmonter ces obstacles, notamment par un recrutement accru de l'hélicase eIF4A (Y. V. Svitkin et al. 2001).

Un grand nombre d'études récentes démontrent néanmoins qu'eIF4E n'est pas le seul facteur de l'initiation à déterminer l'efficacité de traduction des ARNm. La présence de diverses séquences et structures régulatrices dans les régions non-traduites (UTR) semblent dicter la dépendance des ARNm à des voies moléculaires définies. L'identification de ces mécanismes de régulation semble cependant dépendre de la méthode d'analyse utilisée, et génère de nombreuses incohérences. D'élégants travaux ont toutefois permis de comprendre l'origine de ces biais, pour proposer un modèle de traduction sélective par les facteurs de l'initiation.

2.1. L'analyse du traductome

L'émergence des technologies de puces d'expression (microarray) a facilité les études relatives à l'abondance des ARNm dans diverses conditions, ou transcriptomes. Néanmoins, comme évoqué précédemment, de récentes études ont démontré que ce transcriptome n'est pas le seul responsable de l'abondance des protéines correspondantes (protéome), cette dernière étant majoritairement reflétée par l'efficacité traductionnelle des ARNm (traductome) (Schwanhäusser et al. 2011; Ghazalpour et al. 2011).

L'efficacité de traduction d'un ARNm est directement corrélée au nombre de ribosomes auxquels il est associé. La méthode du polysome profiling permet la séparation des ARNm en cours de traduction liés à plusieurs ribosomes (polysomes) des ARN libres et des sous-unités ribosomiques 40S, 60S ainsi que des monosomes 80S par une centrifugation sur gradient de sucrose. Les ARNm associés à plus de 3 ribosomes sont considérés comme efficacement traduits (polysomes « lourds »), et sont isolés des autres fractions, puis identifiés par puces d'expression ou séquençage d'ARN (**figure 20**).

La méthode du ribosome profiling consiste en l'isolement sur génome entier des séquences d'ARN protégées par les ribosomes de la digestion à la RNase. Ces fragments (RPFs) sont par la suite analysés par séquençage ARN (**figure 20**) (Ingolia et al. 2009).

Le polysome profiling, contrairement au ribosome profiling, permet directement l'isolement des ARNm associés aux polysomes « lourds », alors que la quantification des RPFs se fait sur génome entier, incluant ceux des monosomes ou des polysomes « légers ». Il s'avère que cette propriété du polysome profiling le rend plus sensible et permet une lecture plus « profonde » des modifications de traduction (discuté plus bas).

Lors de ce type d'analyse, les événements affectant de quelque manière le niveau basal d'expression de l'ARNm doivent être pris en compte et corrigés, c'est pourquoi l'analyse du transcriptome est réalisée en parallèle. Auparavant, l'estimation de la variation traductionnelle était réalisée par une corrélation simple entre le traduit et le transcrit ou « log ratio approach ». Le développement de l'algorithme ANOTA (analysis of translational activity) par Larsson et collaborateurs permet une lecture plus fidèle des données en introduisant l'analyse de la variance partielle, d'une puissance statistique supérieure (Larsson, Sonenberg, and Nadon 2010). Les travaux de Colman et collaborateurs confirment la puissance de l'algorithme en démontrant une étonnante corrélation entre le traductome et le protéome cellulaire suite à l'infection par HCV (Colman et al. 2013).

L'application de ces méthodes d'analyse aux cancers a récemment permis de démontrer que la traduction sélective des ARNm joue un rôle clef dans la diversité des phénotypes. Ces études révèlent que l'activation oncogénique des voies de signalisation affecte de manière différentielle la traduction de groupes d'ARNm.

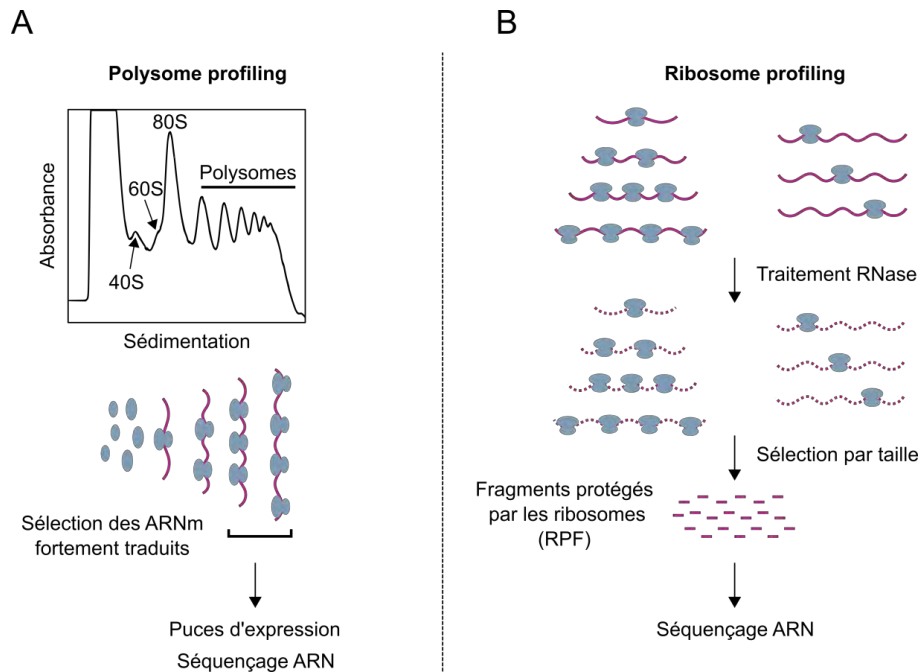


Figure 20 : Les méthodes d'analyse du traductome

A) La méthode du polysome profiling requiert une stratification des ARNm en fonction de leur poids, conditionné par le nombre de ribosomes liés à leur matrice, correspondant à leur efficacité de traduction. Les ARNm les plus efficacement traduits (polysomes lourds) sont purifiés et caractérisés par puces d'expression ou séquençage ARN. **B)** Le ribosome profiling requiert l'isolement des fragments protégés par les ribosomes (RPFs) indépendamment de l'efficacité translationnelle de l'ARNm. Ces fragments sont sélectionnés par leur taille et quantifiés par séquençage ARN. Adapté de Piccirillo et al. 2014.

2.2. Dépendance à eIF4E et motifs en 5'UTR

Parmi les facteurs de l'initiation altérés dans les cancers, eIF4E demeure le mieux étudié, depuis la démonstration *in vitro* que sa surexpression entraîne la transformation de fibroblastes murins (Lazaris-Karatzas, Montine, and Sonenberg 1990). Les travaux de Ruggero et collaborateurs ont par la suite permis de préciser ses propriétés oncogéniques *in vivo* dans le modèle de lymphome B murin Eμ-Myc (Ruggero et al. 2004).

Bien qu'eIF4E soit nécessaire pour l'initiation de la traduction cap-dépendante, une dépendance variable à ce facteur semble exister, définissant un groupe d'ARNm dits « eIF4E-sensibles ». Ces messagers sont impliqués dans les processus de prolifération, survie et transformation, et comprennent les cyclines, les VEGF ou l'oncogène Myc (Bhat et al. 2015). A l'inverse, des variations du niveau d'expression d'eIF4E n'ont que peu d'effet sur la traduction des ARNm de ménage tels que ceux de la GAPDH ou de la β-actine. Ces derniers sont caractérisés par des régions en 5'UTR courtes et peu structurées, alors que les ARNm

« eIF4E-sensibles » semblent posséder des régions 5'UTR longues et complexes, requérant une activité plus importante de l'hélicase eIF4A. eIF4E étant le facteur limitant pour la formation d'eIF4F, sa surexpression favorise le recrutement d'eIF4A à la matrice et la traduction de ces ARNm structurés (Koromilas, Lazaris-Karatzas, and Sonenberg 1992). Les travaux de Feoktistova et collaborateurs ont par ailleurs démontré qu'eIF4E stimule l'activité hélicase d'eIF4A indépendamment de sa capacité à lier la coiffe, par le biais d'une modification conformationnelle d'eIF4G (Feoktistova et al. 2013).

La génération d'un modèle murin déficient pour eIF4E (*Eif4e*^{+/-}) a permis de clarifier la notion de dépendance à ce facteur dans le développement normal et celui du cancer (Truitt et al. 2015). Les données de Truitt et collaborateurs révèlent qu'une diminution de 50% de son expression n'affecte pas le développement ni la physiologie de l'animal. En revanche, cette haploinsuffisance d'eIF4E entraîne une résistance à la transformation par les oncogènes Ras et Myc. Si les niveaux de traduction globale ne sont pas affectés par les variations d'expression d'eIF4E, l'analyse du traductome par polysome profiling révèle en revanche une dépendance de nombreux messagers impliqués dans la réponse au stress oxydatif. La transformation par Ras et Myc provoque en effet une transition de ces ARNm vers les polysomes lourds dans les cellules sauvages, mais pas dans les cellules *Eif4e*^{+/-}. L'analyse de la structure de ces ARNm « eIF4E-sensibles » permet de mettre en évidence un motif présent dans 68% d'entre eux, le CERT (cytosine-enriched regulator of translation) (**figure 21A**).

2.3. Régulation par mTOR et séquences régulatrices

L'identification de structures et séquences spécifiques régulant les ARNm fortement traduits dans les cancers fait l'objet de nombreuses études. L'une des séquences les plus anciennement décrites dans ce contexte est le 5'TOP (5'-terminal oligopyrimidine tract), composé d'une cytosine 5'-terminale suivie de 7 à 13 pyrimidines. Les travaux de Jefferies et collaborateurs ont permis de démontrer que la rapamycine, un inhibiteur de mTOR, empêche la traduction des ARNm contenant ces structures, pour la plupart codant pour des protéines ribosomiques ou des facteurs d'élongation (Jefferies et al. 1994). Si la traduction des ARNm 5'TOP fut dans cette étude imputée aux S6K et à la phosphorylation de la protéine ribosomique S6, les études d'invalidation des S6K démontrent que ces ARNm demeurent insensibles à l'action de la rapamycine dans les cellules issues de souris KO (*S6K1*^{-/-} ; *S6K2*^{-/-}) (Pende et al. 2004).

De récentes études ont permis de démontrer que la traduction des ARNm 5'TOP par mTOR était liée à sa capacité à réguler les répresseurs traductionnels 4E-BPs (Thoreen et al. 2012; Hsieh et al. 2012). Dans l'étude de Thoreen et collaborateurs, l'inhibition de mTOR dans un modèle cellulaire déficient pour les 4E-BPs (MEF DKO) entraîne une insensibilité et un maintien des ARNm 5'TOP dans les fractions fortement traduites. Les travaux de Hsieh et collaborateurs revêtent une importance fondamentale dans le domaine, puisque l'analyse du traductome d'une lignée de cancer de la prostate (PC3) révèle une traduction sélective d'ARNm impliqués dans les processus invasifs. L'inhibition de mTOR par un inhibiteur catalytique (INK128) permet en conséquence une réduction des métastases dans un modèle murin de cancer prostatique. Cette dernière étude identifie un nouveau motif prédictif de la traduction dépendante de mTOR, le PRTE (pyrimidine-rich translational element) (**figure 21A**). En revanche, aucune de ces analyses utilisant la méthode du ribosome profiling n'identifie d'ARNm structuré en 5'UTR, ou « eIF4E-sensible » (**figure 21B**).

L'utilisation de la méthode du polysome profiling par Larsson et collaborateurs démontre un recoupement partiel avec les cibles décrites dans les études précédentes, mais permet d'identifier des ARNm « eIF4E-sensibles » caractérisés par leur longue séquence en 5'UTR (Larsson et al. 2012). Les récents travaux de Gandin et collaborateurs permettent de clarifier cette incohérence en accusant le manque de sensibilité du ribosome profiling, qui ne parvient à identifier selon eux, que les ARNm abondants et à décalage important dans les polysomes (Gandin et al. 2016). L'utilisation du séquençage par nanoCAGE révèle ainsi qu'environ 90% des ARNm régulés par mTOR ne présentent pas de motif TOP, la majorité étant composée d'ARNm aux 5'UTR long, ainsi que d'un groupe minoritaire d'ARNm à 5'UTR court ou TISU (translation initiation of short 5'UTR).

2.4. Régulation par eIF4A

Au sein du complexe d'initiation eIF4F, les fonctions de l'ARN hélicase eIF4A sont de mieux en mieux caractérisées et semblent définir un traductome bien spécifique. Les travaux de Wolfe et collaborateurs ont permis de mettre en évidence les propriétés oncogéniques d'eIF4A dans un modèle murin de leucémie (Wolfe et al. 2014). L'analyse du traductome par ribosome profiling après inhibition pharmacologique de l'hélicase permet de définir un groupe d'ARNm très sensibles à l'arrêt de l'hélicase, caractérisés par la présence de

structures G-quadruplexes dans leur 5'UTR (**figure 21C**). Parmi ces ARNm, de nombreux oncogènes et facteurs de survie tels MYC, MYB, NOTCH ou BCL2.

Les données de Rubio et collaborateurs viennent confirmer ce lien entre l'hélicase et les structures complexes en 5'UTR dans un modèle cellulaire de cancer du sein (Rubio et al. 2014). Si l'enrichissement en G-quadruplexes n'est pas mentionné, eIF4A semble réguler dans ce modèle la traduction spécifique de messagers impliqués dans la prolifération, la survie et l'invasion tumorale. En comparant les effets de l'inhibition de mTOR et de l'inhibition d'eIF4A, les auteurs concluent que la dépendance à eIF4E et à eIF4A définit des traductomes bien distincts.

L'analyse de Gandin et collaborateurs nuance cette dernière conclusion, notamment au travers de la description des ARNm non-TOP régulés par mTOR (Gandin et al. 2016). Selon leur modèle, ces ARNm non-TOP possédant des 5'UTR longs et structurés dépendent à la fois d'eIF4E et d'eIF4A pour leur traduction, alors que ceux possédant des 5'UTR courts dépendent d'eIF4E mais demeurent insensibles à l'inhibition d'eIF4A. En conséquence, l'inhibition de mTOR, en réprimant la traduction de messagers impliqués à la fois dans le métabolisme mitochondrial (5'UTR courts) et l'intégrité de sa membrane (5'UTR longs) conduit à un effet cytostatique. L'inhibition d'eIF4A en revanche, en n'altérant que la synthèse des protéines de l'intégrité mitochondriale, déclenche l'apoptose.

La relative discordance retrouvée dans ces analyses a vraisemblablement pour origine la méthode d'analyse utilisée. Les différences de sensibilité du polysome profiling et du ribosome profiling sont d'ailleurs largement explorées par Gandin et collaborateurs. Il semblerait que le polysome profiling soit supérieur dans la détection des variations traductionnelles discrètes alors que le ribosome profiling permet d'obtenir une position du ribosome à l'échelle du nucléotide. Dans la littérature, les meilleurs exemples illustrant ces différences sont constitués par les travaux du groupe de Ruggero, qui n'identifiaient que des ARNm 5'TOP par la méthode du ribosome profiling (Hsieh et al. 2012), alors que l'utilisation du polysome profiling mettait en évidence une majorité d'ARNm non-TOP comme étant régulés par eIF4E (Truitt et al. 2015). Ces méthodes semblent donc complémentaires, néanmoins l'approche offerte par le polysome profiling permet d'obtenir une meilleure information de l'état translationnel global.

Dans leur ensemble, les analyses de traductomes vont probablement se banaliser, à un moment où les inhibiteurs traductionnels commencent à intégrer des essais thérapeutiques. L'étude des conséquences précises de ces molécules grâce à ces méthodes est nécessaire à la validation de leur spécificité et à la recherche de marqueurs de réponse, deux critères clés pour l'obtention de résultats en phases cliniques (Cook et al. 2014).

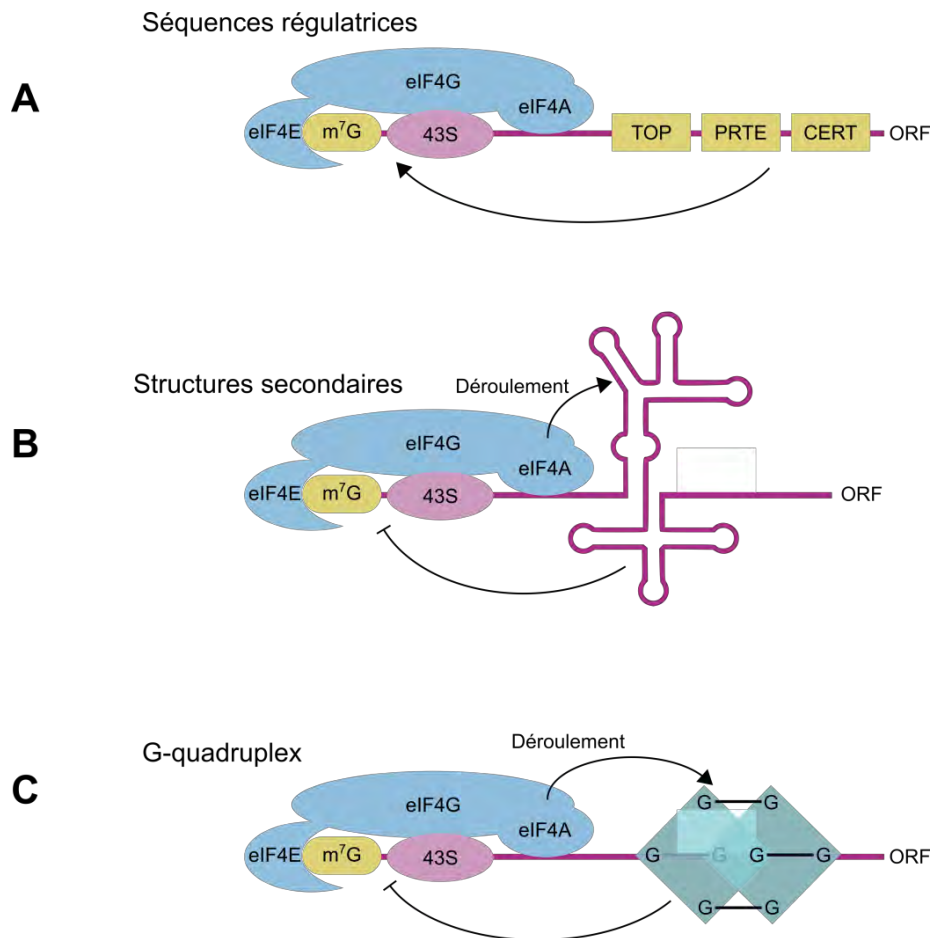


Figure 21 : Structures et séquences régulatrices en 5'UTR

A) De nombreux motifs situés en 5'UTR ont été décrits comme stimulant la traduction cap-dépendante de certains messagers dans le contexte tumoral. Si leur mode d'action précis demeure inconnu, il pourrait inclure le recrutement de facteurs transactivateurs. (TOP : track of oligopyrimidines ; PRTE : pyrimidine-rich translational elements ; CERT : cytosine-enriched regulator of translation). **B)** Les structures secondaires situées dans la région non-codante des ARNm (5'UTR) peuvent engendrer une traduction sélective en conférant aux ARNm une sensibilité accrue au complexe eIF4F. Ce dernier favorise le déroulement de ces structures par l'action de l'hélicase eIF4A. **C)** Les structures G-quadruplexes sont notamment hautement dépendantes d'eIF4A pour leur traduction.. Adapté de Truitt et Ruggero 2016.

C. Ciblage de la traduction en cancérologie

Comme évoqué dans les chapitres précédents avec le cas de l'ADK, l'hétérogénéité génétique intra-tumorale représente un obstacle majeur au succès des thérapies ciblées. L'altération différentielle des voies de signalisation oncogéniques dans les cellules cancéreuses facilite ainsi l'émergence de clones résistants aux inhibiteurs et autres anticorps monoclonaux. Le fait que la traduction intègre la plupart des signaux oncogéniques intracellulaires rend le ciblage de ses composants particulièrement prometteur, et suggère un possible évitement de cette hétérogénéité génétique. Pour preuve, l'homoharringtonine, déjà approuvée en clinique, démontre une efficacité redoutable, et une tolérance bien plus élevée que nombre d'agents de thérapie ciblée (O'Brien et al. 1995). Néanmoins, les nouvelles stratégies, notamment celles ciblant le complexe d'initiation eIF4F, semblent prometteuses dans une perspective de « canalisation » des signaux oncogéniques intracellulaires (**figure 22**).

1. Ciblage des régulateurs d'eIF4F

Le ciblage d'eIF4F est au centre de nombreuses stratégies visant à inhiber la traduction, eu égard à sa localisation en aval des voies PI3K et MAPK et de l'altération de ses composants dans de nombreux cancers (**tableau 2**). Ces stratégies peuvent se classer en deux types : celles visant à réprimer les régulateurs de la formation du complexe, et celles ciblant directement les composants d'eIF4F.

1.1. Les inhibiteurs de la voie PI3K/mTOR

L'activité d'eIF4F peut être ciblée par les inhibiteurs de la voie PI3K/AKT/mTOR, qui entraînent la déphosphorylation des 4E-BPs et la séquestration d'eIF4E. La rapamycine est un macrolide antifongique, initialement caractérisé comme ciblant spécifiquement la kinase mTOR, par le biais du complexe FKBP12. La liaison de ces protéines à la kinase entraîne un changement conformationnel, fragilisant l'interaction entre mTOR et son adaptateur Raptor au sein du complexe mTORC1, alors que mTORC2 n'est pas affecté (Yip et al. 2010). De nombreux dérivés de la rapamycine sont déjà approuvés pour le traitement de certains cancers, tel que le temsirolimus et l'everolimus pour le traitement du carcinome à cellules claires du rein (Motzer et al. 2008). Dans d'autres cas, leur efficacité s'est avérée décevante,

vraisemblablement en raison de leur incapacité à déphosphoryler totalement les 4E-BPs et par l'activation d'une boucle de rétrocontrôle négative entraînant l'activation des MAPK (Carracedo et al. 2008).

Ces effets de l'inhibition de mTORC1 sur les voies de signalisation parallèles sont supprimés par l'utilisation d'inhibiteurs doubles de PI3K et mTOR, comme démontré par Serra et collaborateurs dans divers modèles cellulaires de cancer du sein (Serra et al. 2008). Ces molécules, tels que le NVP-BGT226 et le NVP-BEZ235, sont actuellement en phase d'évaluation clinique, bien que le NVP-BEZ235 ait déjà démontré des résultats décevants, notamment dans le traitement des tumeurs neuroendocrines, où la progression n'est pas affectée (**figure 22**)(NCT01628913).

Les inhibiteurs de site actif de mTOR (asTORi ou TORKi), tels que le PP242 dont la synthèse est rapportée en 2009, se révèlent bien plus efficaces que la rapamycine puisqu'ils entraînent une déphosphorylation complète des 4E-BPs, de rpS6, ainsi qu'une inhibition de mTORC2 (Feldman et al. 2009). Ces inhibiteurs catalytiques ont démontré une efficacité et une spécificité nettement supérieure à la rapamycine, notamment le MLN0128 et l'AZD8055 dans des modèles précliniques de cancer prostatique, du poumon, ou de glioblastome (Hsieh et al. 2012; Chresta et al. 2010). Ces molécules sont actuellement en phase I ou II pour divers types de cancers, afin d'en évaluer la dose maximale tolérée (clinicaltrials.gov).

De nombreuses études rapportent cependant que l'expression des facteurs d'initiation modulent la sensibilité à ces inhibiteurs (inhibiteurs doubles et asTORi), jusqu'à entraîner de véritables résistances. Ilic et collaborateurs rapportent une résistance au NVP-BEZ235 dans un modèle de tumeur mammaire, ayant pour origine une amplification de Myc ou du facteur d'initiation eIF4E (Ilic et al. 2011). Les données de Cope et collaborateurs rapportent que l'exposition chronique à l'AZD8055 dans un modèle de cancer colorectal entraîne l'émergence de clones présentant une amplification d'eIF4E et une augmentation de la synthèse protéique (Cope et al. 2014). Alain et collaborateurs démontrent finalement qu'au-delà de l'expression des facteurs d'initiation, le ratio eIF4E/4EBP constitue le véritable déterminant de l'efficacité des inhibiteurs catalytiques de mTOR *in vivo* et qu'il pourrait servir de marqueur prédictif de réponse en clinique (Alain et al. 2012).

1.2. Les inhibiteurs de MAPK

Si le rôle biochimique de la phosphorylation d'eIF4E est discuté, son implication dans ses capacités oncogéniques est largement démontrée (partie B.1.2 de ce chapitre). Plusieurs inhibiteurs des kinases MNK ont ainsi été décrits, le CGP57380 et le cercosporamide étant les mieux caractérisés. Le cercosporamide a démontré un effet probant *in vivo* dans un modèle de cancer du poumon et de leucémie aigüe myéloïde (Konicek et al. 2011; Altman et al. 2013). Le CGP57380 a démontré un étonnant effet synergique avec le RAD001 dans un modèle de xénogreffes de cancer du poumon non à petites cellules, ainsi qu'un effet potentialisant du temozolomide dans un modèle cellulaire de glioblastome (Wen et al. 2016; Grzmil et al. 2016). Une approche récente décrite par Ramalingam et collaborateurs consiste en une dégradation des MNK par des agents bloquants du métabolisme de l'acide rétinoïque (RAMBA), efficace *in vitro* dans des modèles cellulaires de cancer du sein (Ramalingam et al. 2014).

L'efficacité des inhibiteurs de MNK dans de nombreux modèles pré-cliniques de cancer souligne le potentiel thérapeutique de ces molécules. Par ailleurs, la spécificité d'inhibiteurs déjà existants vis-à-vis de ces kinases pourrait précipiter la mise en place d'essais cliniques chez l'homme. Le merestinib et le cabozantinib, deux inhibiteurs de c-Met, ont démontré des effets, respectivement dans des modèles murins de glioblastome et de neurofibrosarcome (Bell et al. 2016; Lock et al. 2016). Dans les deux cas, l'efficacité des molécules est attribuée à l'inhibition des MNK et de la phosphorylation d'eIF4E.

2. Les inhibiteurs du complexe d'initiation

2.1. Inhibition d'eIF4E

L'une des premières stratégies visant à cibler directement le complexe d'initiation eIF4F fut l'utilisation d'oligonucléotides anti-sens dirigés contre eIF4E (eIF4E ASO). Graff et collaborateurs démontrent pour la première fois *in vivo* que ces oligonucléotides ciblent les cellules cancéreuses, sans altérer les cellules saines ni la synthèse protéique globale, malgré une réduction de 80% de l'expression d'eIF4E (Graff et al. 2007). Ce constat est confirmé par les travaux de Truitt et collaborateurs cités précédemment, où la perte d'eIF4E en hétérozygote n'entraîne aucun effet délétère sur l'animal (Truitt et al. 2015). Si cette stratégie

semble prometteuse, les résultats d'une phase I/II dans des cancers colorectaux démontrent une absence d'effet sur la régression tumorale, malgré une tolérance élevée du produit (NCT01675128).

Une autre approche visant à inhiber l'activité d'eIF4E réside dans sa titration, puisque son activité oncogénique dépend de sa liaison à la coiffe des ARNm (Wendel et al. 2007). Une des premières molécules décrites comme un analogue de coiffe est la ribavirine, un analogue synthétique de guanosine jusqu'alors utilisé comme traitement antiviral pour l'hépatite C. Sa spécificité est largement débattue, puisque les travaux de Kentsis et collaborateurs démontrent un effet anti-oncogénique de cette molécule *in vivo*, alors que le groupe de Pelletier prouve que la ribavirine ne décroche pas eIF4E d'une colonne-coiffe, ni n'altère la traduction cap-dépendante (Kentsis et al. 2004; Yan et al. 2005). Ainsi l'effet probant observé chez des patients atteints de leucémie aigüe myéloïde pourrait être attribué à d'autres propriétés de la ribavirine, indépendantes de la traduction (Assouline et al. 2009). Le développement d'un nouvel inhibiteur, rapporté par Li et collaborateurs, semble avoir une action spécifique sur eIF4E (S. Li et al. 2013). Le 4Ei-1 est en effet capable de causer la dégradation d'eIF4E et potentialise *in vitro* l'action de la gemcitabine sur des lignées de cancer du poumon.

2.2. Ciblage de l'interaction eIF4E-eIF4G

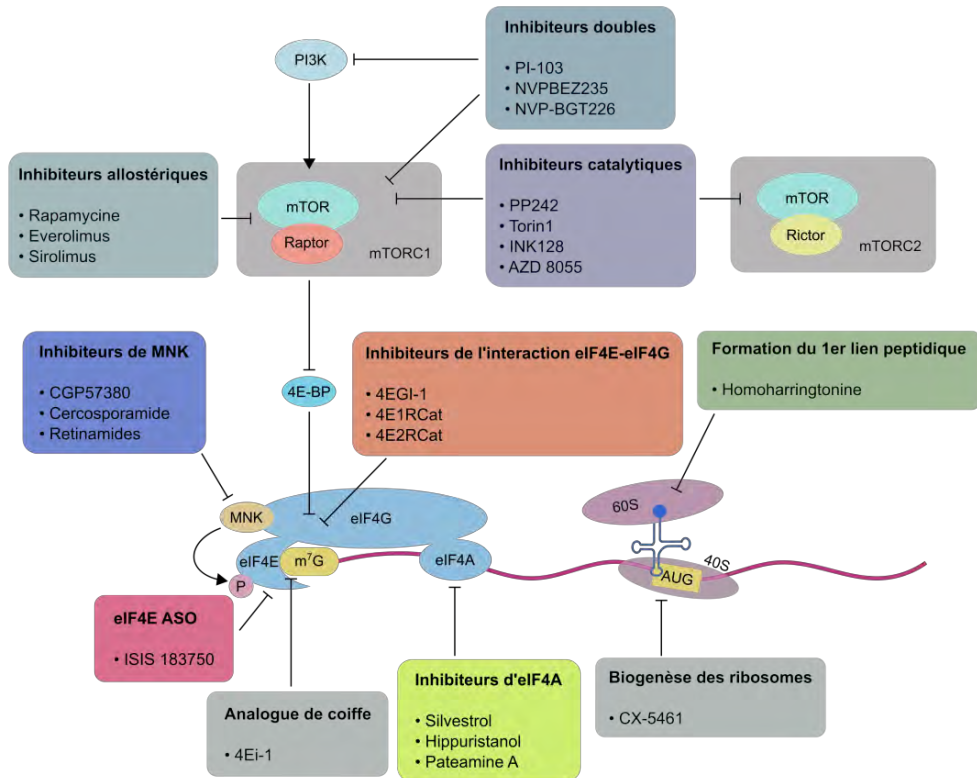
Une stratégie très prometteuse par sa spécificité consiste à inhiber l'interaction entre eIF4E et eIF4G et à empêcher la formation du complexe eIF4F. eIF4G se lie sur la face dorsale d'eIF4E mais aussi en partie sur l'ARN, entraînant une stabilisation globale du complexe sur la coiffe (Yanagiya et al. 2009). Les 4E-BPs, afin d'inhiber la traduction, se lient à la place d'eIF4G et empêche la formation d'eIF4F. Le 4EGI-1, le 4E1RCat et le 4E2RCat furent identifiés par criblage à haut-débit comme des compétiteurs de l'interaction eIF4E-eIF4G, autrement dit des mimétiques de 4E-BPs (Moerke et al. 2007; Regina Cencic et al. 2011; R. Cencic et al. 2011). Les travaux de Cencic et collaborateurs dans un modèle murin Eμ-Myc démontrent notamment une potentialisation de la doxorubicine et un rallongement de la survie avec le 4E1RCat.

2.3. Les inhibiteurs d'hélicase

L'hippuristanol, la patéamine A et le silvestrol sont des inhibiteurs de l'ARN hélicase eIF4A et inhibent la traduction. L'hippuristanol interagit avec le domaine C-terminal de l'hélicase et empêche sa liaison à l'ARN, qu'elle soit sous sa forme libre ou au sein du complexe eIF4F. La patéamine A et le silvestrol stimulent au contraire son activité et sa liaison à l'ARN, entraînant une dimérisation et un arrêt de son activité (Bordeleau et al. 2006; Cencic et al. 2009). Des 3 molécules, le silvestrol semble la plus prometteuse, comme illustré par les travaux de Bordeleau et collaborateurs démontrant une amélioration de la survie dans un modèle murin de lymphome (Bordeleau et al. 2008). Par ailleurs, son mécanisme a récemment été démontré comme étant hautement spécifique, par validation à l'aide du système CRISPR/Cas9 (Chu et al. 2016). En effet, la mutation d'un unique acide aminé d'eIF4A1 (F163L) entraîne une insensibilité au silvestrol *in vitro* et *in vivo*.

Le ciblage de la traduction semble donc pouvoir être accompli à l'aide de multiples approches. Celles visant à inhiber spécifiquement les membres du complexe eIF4F sont notamment appuyées par un panel de molécules très spécifiques et efficaces. Ces agents ont permis de démontrer que l'initiation de la traduction constitue un point de rencontre des signaux oncogéniques, et un « nœud » de résistance à bon nombre de thérapies (Bordeleau et al. 2008; Boussemart et al. 2014). Ainsi les récents travaux de Boussemart et collaborateurs révèlent que la formation d'eIF4F est stimulée par les thérapies anti-BRAF et anti-MEK dans les mélanomes et corrélée à la résistance à ces traitements, chez les patients (Boussemart et al. 2014). L'utilisation de dérivés du silvestrol permet dans leurs modèles de rétablir la sensibilité aux thérapies ciblées, *in vitro* et *in vivo*.

Les récentes données de la littérature suggèrent que les inhibiteurs de l'hélicase eIF4A présentent un fort potentiel thérapeutique. Les travaux de Iwasaki et collaborateurs décrivent une forte spécificité des rocaglates (silvestrol et dérivés), entraînant un clampage de l'hélicase sur des motifs polypuriques en 5'UTR, et une inhibition spécifique de la traduction de certains messagers (Iwasaki, Floor, and Ingolia 2016). D'autres données surprenantes soulignent une spécificité de cette classe de molécules vis-à-vis des cellules aneuploïdes (Santagata et al. 2013). Il semblerait donc que l'inhibition de l'hélicase eIF4A permette un ciblage spécifique, néanmoins la diversité des molécules utilisées génère une variabilité dans les données obtenues par les différents groupes. Cette stratégie thérapeutique n'en demeure pas moins attractive et apparaît à l'heure actuelle comme le moyen le plus avancé d'inhiber la synthèse protéique de manière très spécifique.



Mécanisme	Inhibiteur	Phase de développement
Inhibiteurs de la voie PI3K/mTOR		
Inhibiteurs allostériques de mTOR	Everolimus	Approuvé : RCC, cancer du sein, tumeurs neuroendocrines
	Temsirolimus	Approuvé : RCC
Inhibiteurs doubles PI3K/mTOR	NVP-BEZ235	Phase I/II : RCC, cancer de la prostate ; Phase II : tumeurs neuroendocrines
	NVP-BGT226	Phase I/II : cancer du sein
Inhibiteurs catalytiques de mTOR	MLN0128	Pré-clinique : cancer de la prostate
	AZD8055	Pré-clinique : xénogreffes
Inhibiteurs de MAPK		
Inhibiteur de MNK	Cercosporamide	Pré-clinique : cancer du poumon
Inhibiteurs du complexe d'initiation		
Réduction de l'expression d'eIF4E	eIF4E ASO (ISIS183750)	Phase I/II : NSCLC, cancer de la prostate
Inhibition de l'interaction eIF4E-eIF4G	4EGI-1	Pré-clinique : xénogreffes
	4E2RCat	Pré-clinique : modèle Eμ-Myc
Inhibiteurs d'eIF4A	Hippuristanol	Pré-clinique : modèle Eμ-Myc
	Pateamine A	Pré-clinique : xénogreffes
	Silvestrol	Pré-clinique : modèle Eμ-Myc
Autres inhibiteurs		
Inhibition de la 1 ^{ère} liaison peptidique	Homoharringtonine	Approuvé : LMC
Déplétion en acides aminés	Asparaginase	Approuvé : leucémie lymphoblastique aigüe et LAM pédiatrique

Figure 22 : Ciblage de la traduction en cancérologie

Adapté de Bhat et al. 2015

RESULTATS EXPERIMENTAUX

Introduction aux résultats expérimentaux

L'adénocarcinome pancréatique demeure l'objet de nombreuses caractérisations visant à élucider ses mécanismes pathogéniques et à mettre en évidence de nouvelles cibles thérapeutiques. Ces études génomiques, transcriptomiques, ou épigénétiques ont jusqu'à présent permis de mettre en lumière divers aspects propres à l'ADK tels que la cinétique d'apparition de ses mutations, ou les voies moléculaires altérés dans ses différents sous-types. En dépit de leur indéniable valeur diagnostic ou pronostic, ces données n'ont pas su apporter de véritable solution thérapeutique au traitement de l'ADK.

Comme brièvement évoqué dans l'introduction bibliographique, l'expression génique a longtemps été considérée comme principalement régulée par la transcription. Cette affirmation n'a été que récemment remise en question par des travaux démontrant que la synthèse protéique joue un rôle primordial dans l'expression des gènes, et que son efficacité est directement corrélée au protéome cellulaire (Schwanhäusser et al. 2011). Il paraît étonnant que les nombreuses études à large échelle aient négligé cet aspect fonctionnel pur, au profit des analyses transcriptomiques.

Si l'importance de la traduction dans le développement des cancers est connue depuis de nombreuses années, les travaux réalisés au cours des 10 dernières années ont permis de réaffirmer son rôle clé et de préciser les mécanismes impliqués. Ainsi divers facteurs de l'initiation de la traduction ont été décrits comme altérés dans les cancers, généralement en faveur du déroulement des processus cancéreux (« hallmarks of cancer »). Au-delà d'une augmentation globale de la synthèse protéique, la plupart des études ont par ailleurs décrit des phénomènes de traduction « sélective », dictant des phénotypes particuliers pour les cancers en question. Ces études s'appuient sur l'analyse de traductome et permettent une description des processus biologiques les plus influents dans la biologie de la cellule cancéreuse (Truitt and Ruggero 2016).

L'ensemble de mon projet de thèse visait à étudier la dérégulation de la traduction dans le contexte de l'adénocarcinome pancréatique et à en identifier les conséquences moléculaires et fonctionnelles. L'objectif général était de définir le niveau d'implication de ce processus dans le développement de ce cancer et de souligner, si tel était le cas, la pertinence de son ciblage.

La perte d'expression de 4E-BP1 dans les tumeurs pancréatiques permet un échappement au contrôle traductionnel

La première partie de mes résultats a abouti à la publication d'un article dans la revue *Oncogene* (3^{ème} auteur), dont l'aspect principal est la description de la perte du répresseur traductionnel 4E-BP1 dans les tumeurs pancréatiques (Martineau, Azar, Müller, et al. 2013). Mon apport majoritaire à ces travaux est constitué par la démonstration que la perte de 4E-BP1 entraîne une résistance aux inhibiteurs allostériques et catalytiques de mTOR. J'ai pu par ailleurs démontrer que l'utilisation d'un mimétique synthétique de 4E-BP (4E2RCat) entraîne la mort cellulaire, indépendamment du statut traductionnel.

ORIGINAL ARTICLE

Pancreatic tumours escape from translational control through 4E-BP1 loss

Y Martineau¹, R Azar^{1,2}, D Müller¹, C Lasfargues¹, S El Khawand¹, R Anesia¹, J Pelletier³, C Bousquet¹ and S Pyronnet^{1,4}

The mRNA cap-binding protein eIF4E (eukaryotic translation initiation factor 4E) permits ribosome recruitment to capped mRNAs, and its phosphorylated form has an important role in cell transformation. The oncogenic function of eIF4E is, however, antagonised by the hypophosphorylated forms of the inhibitory eIF4E-binding proteins 1 and 2. eIF4E-binding protein 1 and 2 (4E-BP1 and 2) are two major targets of the protein kinase mTOR, and are essential for the antiproliferative effects of mTOR inhibitors. Herein, we report that pancreas expresses specifically and massively 4E-BP1 (4E-BP2 is nearly undetectable). However, 4E-BP1 expression is extinguished in more than half of the human pancreatic ductal adenocarcinomas (PDAC). 4E-BP1 shutoff is recapitulated in a mouse genetic model of PDAC, which is based on a pancreas-specific mutation of *Kras*, the more frequently mutated oncogene in human pancreatic tumours. 4E-BP1 downregulation enhances eIF4E phosphorylation and facilitates pancreatic cancer cell proliferation *in vitro* and tumour development *in vivo*. Furthermore, 4E-BP1 loss combined with the absence of 4E-BP2 renders eIF4E phosphorylation, protein synthesis and cell proliferation resistant to mTOR inhibition. However, proliferation can be better limited by a recently developed compound that mimics the function of 4E-BP1 and 2 independently of mTOR inhibition.

Oncogene (2014) 33, 1367–1374; doi:10.1038/onc.2013.100; published online 8 April 2013

Keywords: 4E-BP1; pancreatic cancer; translation initiation; eIF4E phosphorylation

INTRODUCTION

One emerging cellular process in cancer biology is the deregulation of translation initiation control. In eukaryotic cells, most mRNAs are translated via a cap-dependent process. Cap-dependent translation is mediated by the cap-binding protein eIF4E (eukaryotic translation initiation factor 4E). Together with the large scaffolding protein eIF4G and the RNA helicase eIF4A, eIF4E forms the eIF4F complex that recruits the ribosome at the mRNA 5' cap structure (for review refer to Sonenberg *et al.*¹). eIF4E level is increased in many human tumours, and eIF4E overexpression promotes tumour formation in animal models (reviewed in Blagden and Willis²). The activity of eIF4E depends also on its phosphorylation in a unique site, which is phosphorylated by the MNK1 and MNK2 (MNK1/2) protein kinases.³ As both kinases use a docking site in eIF4G,⁴ eIF4E phosphorylation is expected to be enhanced when the eIF4F complex is assembled. The use of mice carrying a non phosphorylatable mutant of eIF4E⁵ or lacking both MNK1 and MNK2 kinases⁶ has revealed that the phosphorylation of eIF4E contributes to cell transformation and tumour development.

The translational function of eIF4E is however antagonised by the hypophosphorylated forms of inhibitory proteins termed eIF4E-binding protein 1 and 2 (4E-BP1 and 2, 4E-BP1/2) (for review refer to Martineau *et al.*⁷). Hypophosphorylated 4E-BP1/2 compete with eIF4G for a common binding site on eIF4E, thus resulting in the dissociation of the eIF4F complex. 4E-BP1 and 2 are two major substrates of the serine/threonine kinase mTOR. Consequently, treatment with mTOR inhibitors blocks cell proliferation and

reduces neoplasia through inhibition of 4E-BP1/2 phosphorylation, sequestration of eIF4E and inhibition of translation. These observations provided a rationale for the use of mTOR inhibitors in cancer treatments. The first generation of mTOR inhibitors (rapalogs) is derived from rapamycin, a natural allosteric inhibitor targeting only the mTORC1 complex. Rapalogs have been approved for the treatment of renal cell carcinomas, mantle cell lymphomas and pancreatic neuroendocrine tumours.⁸ They have, however, produced limited therapeutic effects in many other tumours, including pancreatic ductal adenocarcinomas (PDAC).⁹ Better therapeutic effects are expected by the use of new inhibitors (such as PP242, Torin-1 and derivatives) that interact directly with the active site of the kinase, and thus target both mTORC1 and mTORC2 complexes.⁸

PDAC is one of the most intractable malignancies. Gemcitabine is the currently used chemotherapeutic compound, but it elicits only minor therapeutic responses and the overall 5-year survival rate remains <5%.¹⁰ Thanks to the generation of mouse models based on the main genetic alterations found in human tumours, considerable progress has been made in understanding the process of pancreatic carcinogenesis. PDAC affects the exocrine compartment of the pancreas whose normal function is to synthesise and secrete digestive enzymes. In the acinar cells of the exocrine pancreas, the regulation of eIF4E activity by its inhibitory proteins has been shown to have a critical physiological role in regulating the biosynthesis of digestive enzymes.^{11,12} However, the status and roles of 4E-BP1 and 2 have never been explored in PDAC. In this study, we show that whereas normal

¹Université de Toulouse, Centre de Recherche en Cancérologie de Toulouse (CRCT), Equipe Labellisée Ligue Contre le Cancer and Laboratoire d'Excellence Toulouse Cancer, INSERM UMR-1037, Toulouse, France; ²Department of Clinical Pharmacy, Faculty of Pharmacy, Lebanese University, Hadath, Lebanon; ³Department of Biochemistry and Goodman Cancer Research Center, McGill University, Montreal, Quebec, Canada and ⁴Pôle digestif, Centre Hospitalier Universitaire de Rangueil, Toulouse, France. Correspondence: Dr S Pyronnet, Université de Toulouse, Centre de Recherche en Cancérologie de Toulouse (CRCT), Equipe Labellisée Ligue Contre le Cancer and Laboratoire d'Excellence Toulouse, INSERM UMR-1037, BP 84225, Toulouse 31432, France.
E-mail: stephane.pyronnet@inserm.fr

Received 17 September 2012; revised 14 January 2013; accepted 4 February 2013; published online 8 April 2013

pancreas expresses exclusively 4E-BP1, its expression is severely repressed in half of the human pancreatic tumours. 4E-BP1 loss enhances eIF4E phosphorylation, accelerates cell proliferation and tumour development, and strongly reduces the sensitivity of pancreatic cancer cells to the active-site mTOR inhibitors. We show, however, that compounds mimicking 4E-BP1/2 function independently of mTOR inhibition can substitute for mTOR inhibitors in cancer cells lacking both 4E-BP1 and 2.

RESULTS

Loss of 4E-BP1 expression in pancreatic carcinogenesis

Although the pancreas is the organ that expresses the highest levels of 4E-BP1 (refs 13,14 and data not shown), the status of 4E-BP1 protein in the different cell lineages that compose the exocrine pancreas remained unknown. Consistently with a role of

4E-BP1 in the production of digestive enzymes,^{11,12} the analysis of normal human pancreas by immunohistochemistry revealed that 4E-BP1 is massively expressed in enzyme-producing acinar cells, whereas the protein was in contrast barely detectable in normal duct cells (Figure 1a, normal sample).

4E-BP1 expression was then analysed in a series of 20 human samples, including 3 normal cases obtained after autopsy and 17 PDACs obtained after surgical resections. 4E-BP1 staining was evaluated in acinar and duct cells of normal pancreas, as described above, and in cancerous areas of surgical PDAC samples. The data revealed that 4E-BP1 is either not or poorly expressed in more than half (9/17) of the PDAC samples (Supplementary Table 1). A typical sample with 4E-BP1 loss in cancerous lesions is shown (Figure 1a, PDAC sample).

The formation of pancreatic tumours is characterised by graded stages of preneoplastic lesions. Two of them have been termed ADM (acinar-to-ductal metaplasia) and PanIN-1–3 (pancreatic

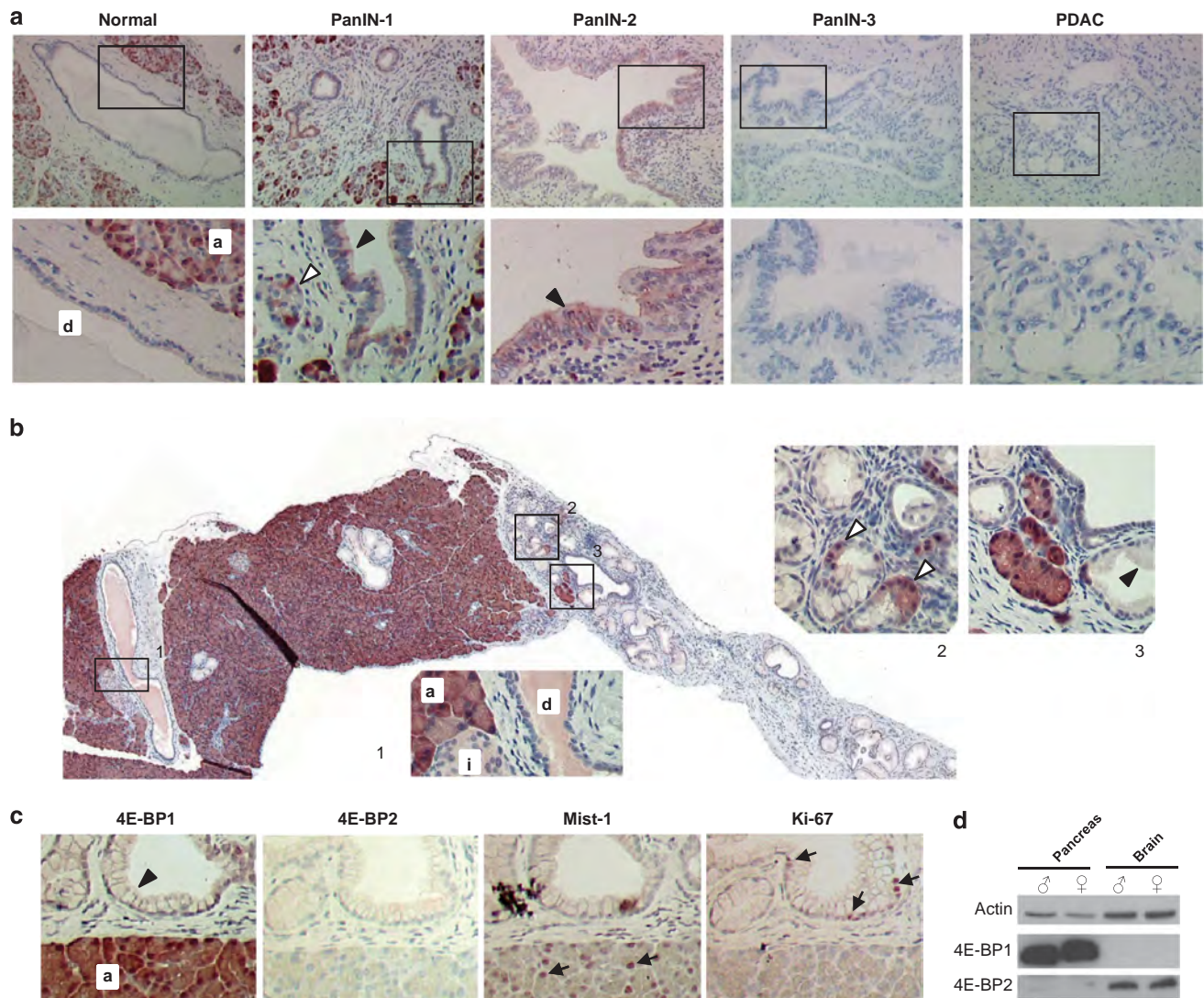


Figure 1. Loss of 4E-BP1 expression in pancreatic carcinogenesis. (a) 4E-BP1 protein level in human pancreas and pancreatic tumours was assessed in sections of paraffin-embedded samples by immunostaining. Top, representative images of normal pancreas, PanIN-1, PanIN-2, PanIN-3 and PDAC are shown. Magnifications: $\times 20$. Bottom, enlargement of typical zones. (b) 4E-BP1 protein level in the pancreas of 10-month-old Pdx1cre-Kras^{G12D} mice was assessed by immunostaining. An entire section of the pancreas was reconstituted using the Explora Nova Mosaic software. Magnification: $\times 10$. Insert 1 corresponds to a pancreatic area with no preneoplastic lesions, whereas inserts 2 and 3 contain ADM and PanIN lesions. (c) Serial sections of the pancreas of 10-month-old Pdx1cre-Kras^{G12D} mice were immunostained with anti-4E-BP1, anti-4E-BP2, anti-Mist-1 and anti-Ki-67 antibodies. Nuclei positive for Mist-1 and Ki-67 are denoted by black arrows. Magnification: $\times 40$. (d) 4E-BP1 and 2 protein levels in extracts from pancreas and brains of male and female mice were analysed by western blotting using specific antibodies. Actin was visualised as a loading control. a, acini; d, duct; i, islet; black arrowheads, PanIN; white arrowheads, ADM.

intraepithelial neoplasms 1–3).¹⁵ These progressive lesions are correlated with a temporal sequence in genetic alterations. The mutation of *Kras* appears as a priming event which when combined with the loss of at least one tumour suppressor, such as *p16^{INK4}*, *TP53* and *Smad4*, eventually produces an aggressive PDAC, containing cancer cells with a duct-like phenotype.¹⁵ To gain insight into the dynamic expression of 4E-BP1 in the process of carcinogenesis, we have analysed 4E-BP1 expression in ADM and PanIN lesions that are found in the periphery of human pancreatic tumours. In the acinar compartment, the massive expression of 4E-BP1 appeared downregulated, as attested by the decrease in 4E-BP1 staining observed in ADM lesions (Figure 1a, white arrowhead). In ducts, 4E-BP1 protein appeared transiently over-expressed, peaking in early PanIN-1 and 2 (Figure 1a, black arrowheads), and returning to basal low levels or becoming undetectable as the pathology further progresses to PanIN-3 and PDAC.

As ADM and PanIN are generally found in the periphery of human samples obtained after surgical resection of advanced PDAC, these lesions cannot be considered as 'true' preneoplastic intermediates. We have therefore looked at 4E-BP1 and 2 expressions in a dynamic model of pancreatic carcinogenesis based on the pancreas-specific mutation of *Kras* (hereafter named *Pdx1Cre-Kras^{G12D}*).¹⁵ At 10-month old, 30% of the pancreas of these mice are replaced by preneoplastic lesions consisting of ADM, which progressively convert into PanIN (Figure 1b). The metaplastic intermediates originate from transdifferentiation of acinar cells into duct-like cells, characterised by the loss of acinar markers such as the transcription factor Mist-1.¹⁶ As observed in human pancreas, 4E-BP1 appears massively expressed specifically in acinar cells of mouse pancreas (Figure 1b, inset 1), but downregulated in ADM intermediates (Figure 1b, inset 2, white arrowheads), and maintained silenced thereafter in PanIN lesions (Figure 1b, inset 3, black arrowhead), suggesting that 4E-BP1 protein extinction in *Kras*-induced carcinogenesis occurs in early lesions. The staining of serial sections with anti-Mist-1 and anti-Ki-67 antibodies indeed revealed that 4E-BP1 extinction is concomitant to both dedifferentiation of acinar cells (attested by the loss of Mist-1 nuclear staining) and increased proliferation rates (attested by Ki-67 nuclear staining) (Figure 1c). Furthermore, 4E-BP2 could not be detected in mouse pancreas by immunohistochemistry (Figure 1c).¹³ A western blot analysis of extracts from normal pancreas and brain also confirmed that 4E-BP2 is very poorly expressed in the mouse pancreas while this protein is found in the central nervous system (Figure 1d), as previously described.^{13,17}

These data reveal that 4E-BP1 is the only member of 4E-BP family expressed in the pancreas, and that its expression is extinguished early in pancreatic carcinogenesis.

4E-BP1 loss enhances eIF4E phosphorylation

As the MNK1/2 kinases use a docking site in eIF4G to efficiently phosphorylate eIF4E,⁴ we anticipated that 4E-BP1 extinction (combined with the absence of 4E-BP2) and consequent interaction between eIF4E and the eIF4G-MNK1/2 subcomplexes in pancreatic cancer cells would enhance eIF4E phosphorylation. Such hypothesis is of particular interest in pancreatic tumours, as the MNK1/2 kinases are direct substrates of the MAPK that can be activated downstream of *Kras*, the most frequently mutated oncogene in pancreatic tumours. Furthermore, a recent report showed that eIF4E phosphorylation correlates with poor prognosis and is further enhanced upon treatment with gemcitabine via the expression of a constitutively active splice variant of MNK2.¹⁸ To test this hypothesis, we first searched for pancreatic cancer cell lines that naturally express different levels of 4E-BP1. To limit the impact that the different genetic profiles of established cell lines could have in data interpretation, we opted for MiaPaca-2 and Panc-1 cells. These two cell lines actually exhibit identical genetic profiles in the main oncogenic pathways of pancreatic cancer,

including the activating mutation of the *Kras* oncogene and alterations in the *p16^{INK4}*, *TP53* and *Smad4* tumour suppressors (Supplementary Table 2). Furthermore, both cell lines express similar levels of eIF3b, eIF4A and eIF4G1, and undetectable levels of 4E-BP2 (Figure 2a). MiaPaca-2 cells, however, express higher levels of 4E-BP1 than Panc-1 cells do and consistently, while both cell lines contain almost comparable amounts of eIF4E, the level of eIF4E phosphorylation is higher in Panc-1 cells (Figure 2a). To more directly test for the involvement of 4E-BP1 extinction in enhanced eIF4E phosphorylation, we then monitored the level of eIF4E phosphorylation in MiaPaca-2 cells, where 4E-BP1 expression was permanently silenced using specific short hairpin RNA (shRNA). As expected, 4E-BP1 extinction in MiaPaca-2 cells enhances eIF4E phosphorylation (Figure 2b). Similar results were obtained when cells were transiently transfected with a small interfering RNA (siRNA) that targets a sequence in 4E-BP1 different from the sequence targeted by the shRNA (data not shown). The status of eIF4E phosphorylation was then explored in human samples. In the normal pancreas, eIF4E appears phosphorylated in the high rates of protein synthesis in this compartment), but poorly phosphorylated in duct cells (Figure 2c, left panel). In PDAC samples, a much higher level of phosphorylation is detected in duct-like cancer cells (Figure 2c, right panel). These data indicate that in addition to the expected activation of MNK1/2 kinases due to the mutation of *Kras*, 4E-BP1 extinction (combined with the absence of 4E-BP2) likely participates in the induction of eIF4E phosphorylation in pancreatic tumours.

4E-BP1 extinction and tumour growth in nude mice

As 4E-BP1 loss correlated with Ki-67 positivity in the metaplastic intermediates found in *Pdx1Cre-Kras^{G12D}* mice (Figure 1c), we hypothesised that 4E-BP1 extinction could facilitate tumour growth. We therefore verified the involvement of 4E-BP1 shutoff

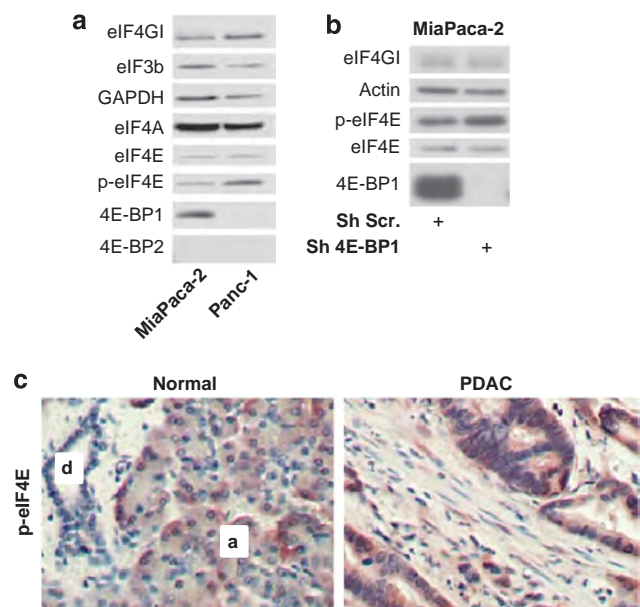


Figure 2. 4E-BP1 expression affects eIF4E phosphorylation. (a) MiaPaca-2 and Panc-1 cells. (b) Scramble or 4E-BP1 shRNA-expressing MiaPaca-2 cells were maintained under normal growth conditions and extracts were subjected to western blotting with the indicated antibodies. (c) eIF4E phosphorylation level in human pancreas and pancreatic tumours was assessed in sections of paraffin-embedded samples by immunostaining. Representative images of normal pancreas and PDAC are shown. Magnifications: $\times 40$. a, acini; d, duct.

in tumour growth by using a similar inducible cell line. MiaPaca-2 cells were chosen because they still express 4E-BP1 (see above). 4E-BP1 was efficiently silenced *in vitro* upon doxycycline induction of specific miRNAs (Figure 3a), and tumour growth in nude mice injected with MiaPaca-2 cells was accelerated after doxycycline treatment (Figure 3b). Accelerated tumour growth correlated with doxycycline-mediated downregulation of 4E-BP1 *in vivo*, although no significant difference in Ki67 immunostaining could be detected (Supplementary Figure 2). Furthermore, *in vivo* treatment with doxycycline did not permit a full extinction of 4E-BP1 (Supplementary Figure 2). This is consistent with our previous finding that MirNeg MiaPaca-2 cells possess a high rate of proliferation, and that 4E-BP1 downregulation in MirBP1 MiaPaca-2 cells only accelerates further such proliferation by shortening cell cycle progression.¹⁹

These results show that the lack of 4E-BP1, combined with the absence of 4E-BP2, may participate in tumour development by providing a proliferative advantage to pancreatic cancer cells.

4E-BP1/2 level and sensitivity to mTOR inhibitors

Hyperphosphorylation of 4E-BP1 and 2, and consequent increase in the rate of protein synthesis are major pathways elicited by

activated mTOR to stimulate the proliferation of cancer cells. Consequently, mTOR inhibitors appear as promising therapeutic compounds.⁸ Our data suggest, however, that the efficiency of mTOR inhibitors in pancreatic tumours might be compromised due to 4E-BP1 loss and 4E-BP2 absence. To test this hypothesis, we have first analysed the effect of two mTOR inhibitors, the rapalog RAD001 and the recently developed active-site mTOR inhibitors PP242,²⁰ in the MiaPaca-2 and Panc-1 cell lines that express different levels of 4E-BP1. The overall data first revealed that upon mTOR inhibition, Panc-1 cells poorly expressing 4E-BP1 survived better than MiaPaca-2 cells regardless of the inhibitor tested (RAD001 or PP242) (Figure 4a). When the compounds were used at doses that produced their maximal effects on survival, a deeper inhibition could be however obtained with the active-site inhibitor PP242 (5 μ M), as compared with that of the allosteric inhibitor RAD001 (0.1 μ M) (Figure 4a). To verify whether such higher resistance of Panc-1 cells to mTOR inhibition was correlated with changes in translation rates, we monitored the rate of protein synthesis using the nonradioactive SUNSET method (based on the measure of puromycin incorporation in elongating peptides).²¹ Consistent with a more marked inhibition of cell survival, PP242-mediated inhibition of mTOR attenuated protein synthesis more efficiently than RAD001. However, inhibition of mTOR by PP242

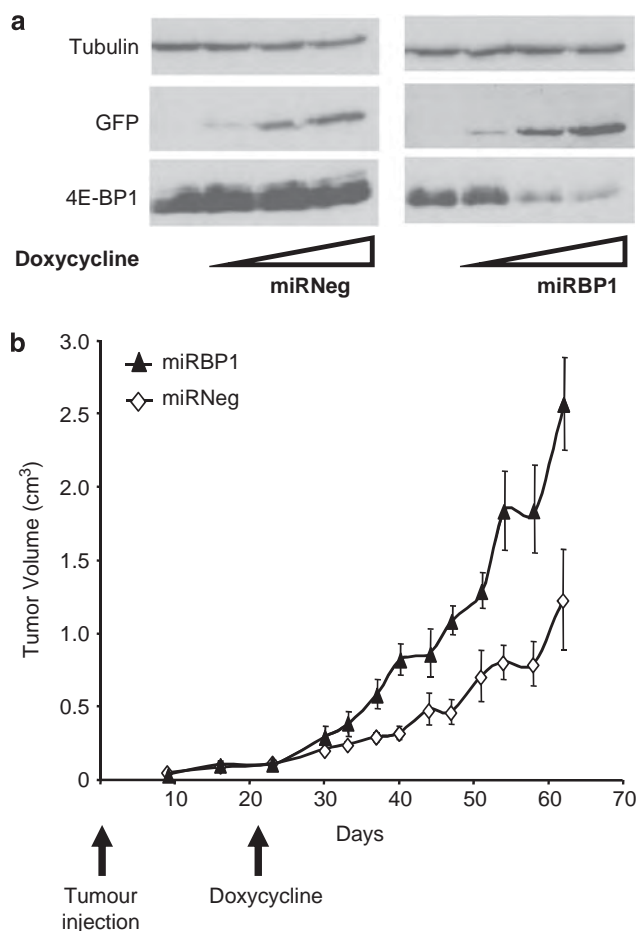


Figure 3. Tumour growth in nude mice. (a) Validation of 4E-BP1 inducible miRNAs. MiaPaca-2 cells stably transfected with inducible miRNeg or miRBP1 were treated with increasing amounts of doxycycline from 0 to 100 ng/ml. Whole-cell lysates were subjected to western blotting using the indicated antibodies. (b) Tumour growth assay. MiaPaca-2 cells expressing inducible miRNeg or miRBP1 were implanted in nude mice and left to grow for 3 weeks. Mice were then treated with doxycycline, and tumour volumes were monitored (mean \pm s.d.).

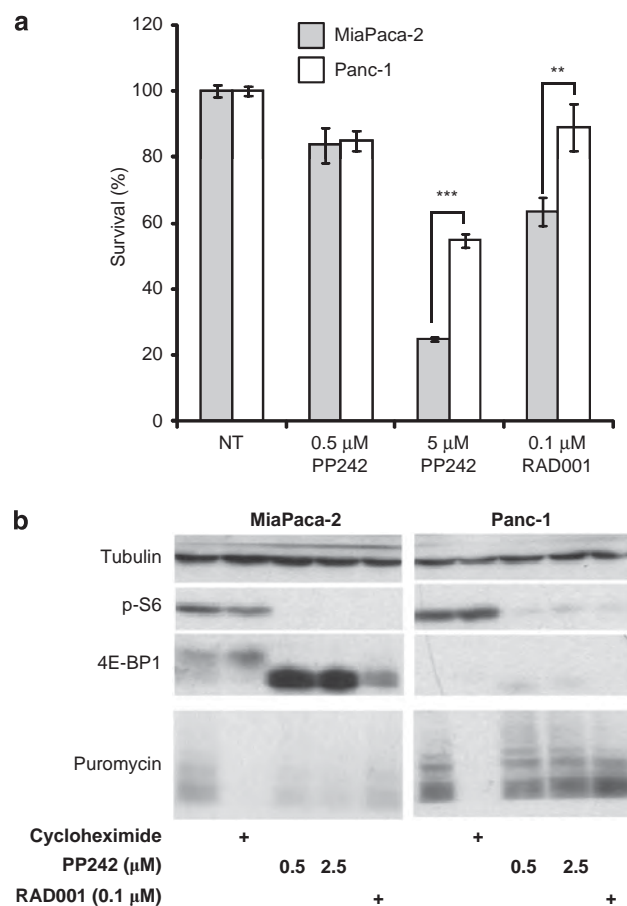


Figure 4. 4E-BP1 expression correlates with resistance to mTOR inhibitors. (a) MiaPaca-2 and Panc-1 cells were subjected to a MTT assay using increasing amounts of PP242 or a high concentration of RAD001 (mean \pm s.e.m. of three independent experiments). (b) MiaPaca-2 and Panc-1 cells were pretreated with 0.5 or 2.5 μ M PP242, or with 0.1 μ M RAD001 for 1 h or 10 μ g/ml cycloheximide for 15 min. Then, cells were labelled with 1 μ g/ml puromycin for 10 min (SUNSET). Extracts were processed for western blotting using the indicated antibodies.

affected protein synthesis less efficiently in Panc-1 cells compared with MiaPaca-2 cells (Figure 4b, puromycin blot). This difference correlated with the status of 4E-BP1 phosphorylation, but not with changes in S6 protein kinase activity, the other major substrate of mTOR involved in the regulation of protein synthesis. The extents of S6 dephosphorylation upon PP242 or RAD001 treatment were similar in both MiaPaca-2 and Panc-1 cells (Figure 4b, upper panels), indicating a minor contribution of S6 phosphorylation in the effects of mTOR inhibitors. These data thus uncovered in pancreatic cancer cells a strong correlation between the resistance to mTOR inhibitors and the lower capability of limiting protein synthesis due to 4E-BP1 loss and 4E-BP2 absence.

To test more directly for the role of 4E-BP1 levels in determining the efficiency of mTOR inhibitors, we tested the effect of PP242 on translation rates in MiaPaca-2 cells where 4E-BP1 expression was either transiently silenced (using 4E-BP1 small interfering RNAs, data not shown) or permanently silenced using specific shRNA (Figure 5). As observed in Panc-1 cells naturally expressing low levels of 4E-BP1, silencing 4E-BP1 in MiaPaca-2 cells prevented PP242-triggered inhibition of protein synthesis (measured by the SUNSET method) independently of the strong inhibitory effect on S6 phosphorylation (Figure 5a). The absence of PP242-mediated inhibition of protein synthesis due to the lack of 4E-BP1 was further attested by the absence of a shift from high (polysomes, containing translating ribosomes) to low (40S and 80S, containing non-translating ribosomes) fractions in a polysome profile assay performed in 4E-BP1-suppressed cells (Figure 5b).

As a consequence of the dissociation of eIF4G-MNK1/2 complex from eIF4E, the binding of the hypophosphorylated forms of 4E-BP1/2 to eIF4E (which can be achieved by mTOR inhibition) compromises eIF4E phosphorylation.⁵ We then hypothesised that 4E-BP1/2 absence in pancreatic cancer cells would render eIF4E phosphorylation constitutive and resistant to mTOR inhibitors. This was first tested in MiaPaca-2 and Panc-1 cell lines naturally expressing different levels of 4E-BP1 (Figure 5c, compare lanes 1 and 2 with lanes 7 and 8), and then confirmed in MiaPaca-2 cells where 4E-BP1 is permanently silenced by shRNAs (Figure 5c, compare lanes 3 and 4 with lanes 5 and 6). These data indicate that 4E-BP1/2 levels have an impact on the sensitivity of eIF4E phosphorylation to mTOR inhibitors.

These data thus reveal that targeting mTOR in pancreatic cancer cells, where 4E-BP1 expression is extinguished (and probably in

other cancer cells lacking 4E-BP1/2), is probably not a good option to inhibit eIF4E phosphorylation and consequent translation initiation.

As mentioned above, the absence of 4E-BP1 and 2 renders eIF4E phosphorylation insensitive to mTOR inhibitors, suggesting that the translational targets of activated eIF4E involved in cell proliferation cannot be downregulated upon mTOR inhibition. We thus anticipated that 4E-BP1 suppression could render MiaPaca-2 cell proliferation resistant to mTOR inhibitors. A proliferation assay confirmed that MiaPaca-2 cells lacking 4E-BP1 are less sensitive to PP242-mediated inhibition of cell proliferation (Figure 6a). The inhibition of cell proliferation due to eIF4E sequestration by 4E-BP1/2 has been attributed to the general inhibition of protein synthesis necessary for the completion of the G1 cell growth phase, and to a more specific effect on a subset of mRNA possessing complex 5' UTRs, which often encode tumour-promoting proteins. Among the mRNAs shown to be selectively stimulated by activated eIF4E (and therefore selectively inhibited by the 4E-BPs), cyclin mRNAs are critical because they encode proteins required for cell cycle progression.^{22,23} Consistently, in addition to the general decrease in protein synthesis observed above, PP242-triggered inhibition of MiaPaca-2 cell proliferation was accompanied by a sustained decrease in cyclin D1 expression. However, upon 4E-BP1 silencing by small interfering RNAs (data not shown) or by shRNAs (Figure 6b), cyclin D1 expression became less susceptible to the inhibitory effects of PP242. These data suggest that persistent cyclin D1 expression upon 4E-BP1 loss (and 4E-BP2 absence) may participate in the resistance of pancreatic cancer cells to PP242-triggered inhibition of mTOR activity and cell proliferation.

As an alternative strategy to mTOR inhibitors, we thought that newly characterised molecules that mimic 4E-BP1/2 functions (i.e., prevention of eIF4F complex assembly) would be of great interest in cancer cells lacking 4E-BP1/2. We therefore tested the efficacy of 4E2RCat, a compound isolated from a high throughput screening of molecules that inhibit the interaction between eIF4E and eIF4G. 4E2RCat appears as a specific inhibitor of cap-dependent translation with limited effects on IRES-driven translation.²⁴ Interestingly, the proliferation of MiaPaca-2 cells was efficiently blocked by 4E2RCat and, more importantly, such inhibition was independent of the intracellular level of 4E-BP1 (Figure 6c).

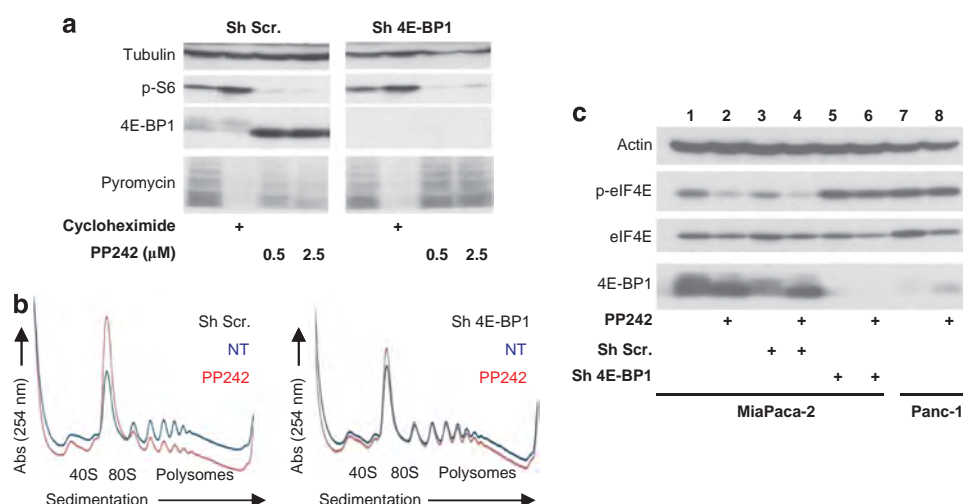


Figure 5. 4E-BP1 silencing renders protein synthesis and phosphorylation of eIF4E resistant to mTOR inhibition. **(a)** Scramble or 4E-BP1 shRNA-expressing MiaPaca-2 cells were treated and subjected to a SUNSET assay, as described in Figure 4B. Cell lysates were subjected to western blotting using the indicated antibodies. **(b)** Cell lines from **(a)** were treated with 1 μM PP242 (red) for 1 h or left untreated (blue). Extracts were separated on 10–50% sucrose gradient and subjected to a polysomal analysis. 40S ribosomal subunits, 80S ribosomes and polysomes are indicated. **(c)** Panc-1 cells and MiaPaca-2 cells from **(a)** were treated with 2.5 μM PP242 for 1 h or left untreated. Cell lysates were subjected to western blotting using the indicated antibodies.

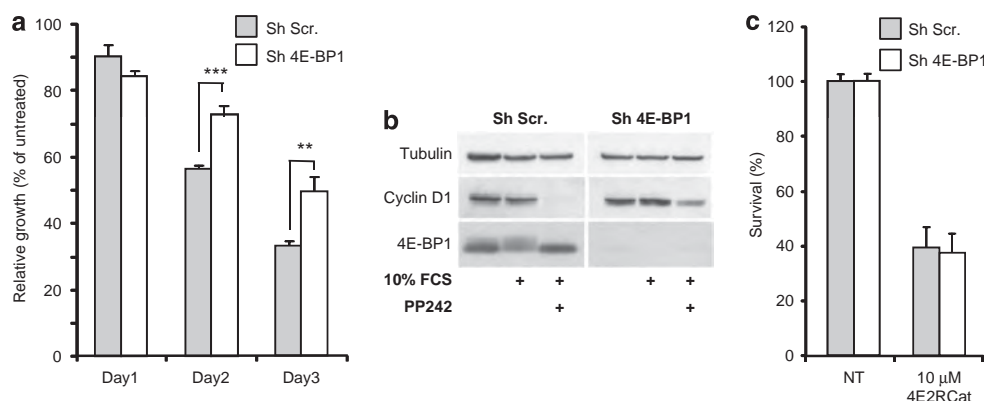


Figure 6. 4E-BP1 silencing renders cell proliferation resistant to mTOR inhibition, but not to 4E-BP mimics. **(a)** Scramble or 4E-BP1 shRNA-expressing MiaPaca-2 cells were daily treated with 0.5 μ M PP242 or left untreated, and proliferation was monitored by cell counting. Proliferation is presented as a percentage of untreated cells (mean \pm s.e.m. of three independent experiments). **(b)** Cell lines from **(a)** were serum-starved overnight followed by 1-h pretreatment with 2.5 μ M PP242 or vehicle alone. Cells were then stimulated with 10% fetal calf serum for 6 h. Cell lysates were subjected to western blotting using the indicated antibodies. **(c)** Cell lines from **(a)** were subjected to a MTT assay using 10 μ M 4E2RCat (mean \pm s.e.m. of three independent experiments).

Taken together, these data demonstrate that a sizable fraction of human pancreatic adenocarcinomas does not or poorly express the critical mTOR targets, 4E-BP1/2. This results in enhanced phosphorylation of eIF4E, faster cell proliferation and tumour progression. They also reveal that increased resistances of eIF4E phosphorylation and cancer cell proliferation to mTOR inhibitors due to the lack of 4E-BP1/2 proteins could be circumvented by the use of molecules mimicking 4E-BPs function independently of PI3K/Akt/mTOR and 4E-BP1/2 status.

DISCUSSION

Although 4E-BP1 and 4E-BP2 are ubiquitously expressed, the amount of each homologue significantly varies among tissues.^{13,14} Our data reveal that 4E-BP1 is massively expressed in the acinar compartment of the exocrine pancreas. However, 4E-BP1 expression in acinar cells dramatically drops early in the process of pancreatic carcinogenesis. Such a strong decrease accompanies the transdifferentiation of acinar cells into metaplastic intermediates that acquire a duct-like phenotype (ADM). This suggests the existence of (one) specific factor(s) responsible for 4E-BP1 expression in differentiated acinar cells, which remain(s) to be identified. Consistently with the loss of 4E-BP1 expression in the process of acinar cell transdifferentiation into duct-like cell, 4E-BP1 protein is barely detectable in normal duct cells. 4E-BP1 levels appear, however, transiently increased in early PanIN lesions. Such a transient induction in duct cells could be explained by our earlier report indicating that 4E-BP1 is a direct target of the transcription factor SMAD4.¹⁹ The role of SMAD4 in PDAC has been linked to its function in TGF β signalling. It is thought that through SMAD4 (also termed DPC4, deleted in pancreatic cancer locus 4), TGF β exerts primarily a protective effect on duct cells. Upon *Smad4* deletion, however, TGF β exerts pro-tumoral actions via the targeting of other signalling pathways. We have shown that 4E-BP1 induction is important for TGF β -mediated inhibition of cell proliferation. It is therefore conceivable that TGF β exerts its initial protective effects in part through a 4E-BP1-dependent inhibition of duct cell proliferation. Consistently, we found that the pattern of 4E-BP1 expression matches perfectly to that of SMAD4 in the different human pancreatic lesions (Supplementary Figure 1 and Supplementary Table 1). As the gene encoding 4E-BP1 protein is neither deleted nor mutated in pancreatic tumours,²⁵ and as its promoter does not appear hypermethylated in the different human-tumour-derived pancreatic cancer cell lines we have tested (not shown), *Smad4* deletion provides a highly probable

explanation for 4E-BP1 downregulation in pancreatic tumours. Regardless of the origin of pancreatic cancer cells (acinar or duct cell), neither 4E-BP1 nor 4E-BP2 were expressed in half of the advanced pancreatic tumours. This is of particular interest in pancreatic cancer because, as opposed to many other cancers, the inactivation of 4E-BP1/2 cannot be explained by a direct activation of the PI3K-AKT-mTOR pathway, as only a very few number of patients with pancreatic tumours harbour mutations of PI3K, AKT or PTEN. To our knowledge, PDAC is the first example of cancer with no 4E-BP. In all other tumours, at least one 4E-BP is indeed expressed. The antitumoral activity of 4E-BP1/2 in these tumours is, however, compromised by hyperphosphorylation^{26–28} due to activation of the mTOR pathway. As hyperphosphorylation of 4E-BP1/2 gives a proliferative advantage to cancer cells, and as 4E-BP1/2 are phosphorylated by mTOR, the use of active-site inhibitors of mTOR in cancer therapy appears promising. As shown in this paper, this could however not apply for PDAC tumours lacking both 4E-BP1 and 2 (Figure 7). Consistently with our findings, a recent report indicates that the eIF4E/4E-BP ratio, rather than their individual protein amount or phosphorylation status, should be considered to predict the efficacy of mTOR inhibitors in tumour treatment.²⁹

One alternative therapeutic strategy in tumours lacking 4E-BP1/2 would be the use of compounds that mimic 4E-BP1/2 functions independently of mTOR inhibition.^{24,30} The pertinence of this alternative strategy is supported by the present study showing that 4E2RCat, one of the recently developed 4E-BP mimics, is capable of limiting proliferation of pancreatic cancer cells devoid of 4E-BP. The use of a related 4E-BP mimic (4E1RCat) has also been shown to be well-tolerated in mice and to sensitise tumour growth to various chemotherapies, leading to an increased tumour-free survival.³⁰ However, higher affinity to eIF4E and bioavailability of 4E-BP mimics are now needed to improve the inhibition of protein synthesis and eIF4E phosphorylation, which remain so far limited (ref. 28 and data not shown). The development of such optimised compounds offers new perspectives in combinatory therapeutics.

MATERIALS AND METHODS

Reagents

Antibodies used are as follows: anti-eIF4G1 was obtained from Dr N Sonenberg (McGill University, Montreal, Quebec, Canada). 4E2RCat was described elsewhere.²⁴ Anti-puromycin (12D10) was obtained from Dr P Pierre (Centre d'Immunologie de Marseille-Luminy, Marseille, France).²¹

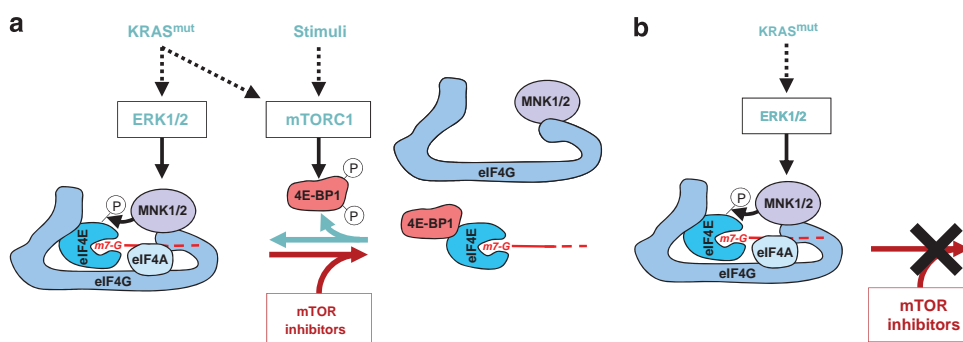


Figure 7. Model of escape from translational control by 4E-BP1/2 loss. **(a)** Upon mTOR inhibition, eIF4E sequestration by hyperphosphorylated 4E-BP1/2 leads to dissociation of the eIF4G-MNK1/2 subcomplex from eIF4E, and consequent inhibition of eIF4E phosphorylation and protein synthesis. **(b)** In the absence of 4E-BP1/2, both eIF4E interaction with eIF4G-MNK1/2 subcomplex, and eIF4E phosphorylation become insensitive to mTOR inhibition. The rate of protein synthesis remains high.

Anti-4E-BP1 (9452 and 9644), 4E-BP2, phospho-S6 (Ser240/244), eIF4A and Cyclin D1 were from Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA). Anti-eIF4E, eIF3b, GFP, Mist-1, SMAD4 and GAPDH were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Anti- β -Tubulin and β -Actin were from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). Other antibodies used in the experiments were anti-Ki-67 (Labvision, Kalamazoo, MI, USA) and anti-phospho-eIF4E Ser209 (Epitomics, Burlingame, CA, USA). Doxycycline, Puromycin, Cycloheximide, CGP57380 and PP242 were from Sigma-Aldrich. RAD001 was a kind gift from Novartis Pharma (Basel, Switzerland).

Immunohistochemistry

Human tumour samples were as follows: 3 normal cases and 17 adenocarcinomas. Mouse pancreas were obtained from 10 to 16-month-old *Pdx1-Cre;LSL-KrasG12D* mice. Serial sections of formalin-fixed, paraffin-embedded samples were incubated with 4E-BP1 (9452), 4E-BP2, Mist-1, phospho-eIF4E, SMAD4 or Ki-67(SP6) antibody. Detection was amplified using peroxidase-conjugated secondary and tertiary antibodies (Dako, Carpinteria, CA, USA). Reactions were revealed with liquid DAB + reagent (Dako) for human samples, and with AEC + Substrate-Chromogen (Dako) for mouse samples. Sections were counterstained with Mayer's hematoxylin solution (Sigma-Aldrich). Images were captured using an Eclipse E400 microscope (Nikon Corporation, Tokyo, Japan) and Explora Nova Morpho Expert/Mosaic Software (Explora Nova, La Rochelle, France).

Subcutaneous xenotransplant tumour model

Mice were maintained in pathogen-free conditions and euthanized according to the ethical regulations. A total of 10^7 MiaPaca-2 cells expressing inducible miRBP1 or miRNeg¹⁹ were inoculated subcutaneously into 8-week-old athymic female mice (Swiss nude/nude). Three days following inoculation, mice were treated with doxycycline (2 mg/ml in drinking water), and tumour dimensions were estimated by the equation: $V = W^2 \times L/2$, where W = width (mm) and L = length (mm). Mice were euthanized 51 days after cell inoculation and tumours were excised for further analyses.

Cell culture

Panc-1, MiaPaca-2 pancreatic cancer cell lines and MiaPaca-2 cells expressing doxycycline-inducible miRBP1 or miRNeg were cultured as previously described.¹⁹ Constitutive silencing was obtained using pLKO vectors (Sigma-Aldrich), as previously described.³¹ shRNA vector accession numbers are: 4E-BP1 TRCN0000040203 and non-target shRNA control SHC002. Small interfering RNAs targeting 4E-BP1 (Applied Biosystems and Life Technologies, Carlsbad, CA, USA, forward 5'-CAAGAACGAACCCUUC CUU-3' and reverse) were transfected using the siPort NeoFx reagent (Applied Biosystems and Life Technologies), according to the manufacturer's instructions.

MTT assay

Cells (3×10^3) were seeded in 96-well plate in culture media supplemented with 2% SVF. The next day, cells were treated with the indicated concentration of PP242 or 4E2RCat. After 3 days, MTT was added at 0.5 mg/ml for 3 h. Cells were then washed with phosphate-buffered saline and lysed with 100 μ l of DMSO. Viability was estimated by measuring absorbance

at 590 nm on MRX plate reader (Dynex Technologies, Guernsey, Channel Islands, GB). Results are expressed as a percentage of untreated cells.

SUnSET assay

The SUnSET assay was used to monitor the rate of protein synthesis. Briefly, 10 min prior to harvesting the cells, puromycin was added to culture medium at 1 μ g/ml. As a control, cycloheximide was added at 10 μ g/ml 15 min before puromycin addition, resulting in complete blockade of protein synthesis. Cell extracts were then processed for western blotting using anti-puromycin antibody.

Proliferation assay

Cells (3×10^4) were plated in six-well dishes in culture media supplemented with 2% fetal calf serum and daily treated with 0.5 μ M PP242. Cells were counted daily with a Coulter counter (Beckman Coulter, Danvers, MA, USA). Results are expressed as a percentage of untreated cells.

Polysome profiling

Scramble or 4E-BP1 shRNA-expressing MiaPaca-2 cells were treated for 1 h with 1 μ M PP242 prior to harvesting. Polysomes analysis was performed as described.³²

SDS-PAGE and western blotting

Cells were harvested on ice, washed twice with cold phosphate-buffered saline and lysed in 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% NP-40 supplemented with protease and phosphatase inhibitors. Protein concentration was measured using Protein Assay reagent (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), and equal amounts of proteins were subjected to SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membrane (BioTraceNT; Pall Corp., Pensacola, FL, USA). Membranes were saturated in 5% non-fat dry milk, incubated overnight with primary antibodies in 5% BSA, washed and revealed according to Cell Signaling Technology protocol.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from INSERM-Université Paul Sabatier and from La LIGUE ('Comités de Hautes-Pyrénées et de Lot-et-Garonne' and 'Equipes Labellisées' programs) to SP. Yvan Martineau was a recipient of Fondation de France and FRM post-doctoral fellowships. Rania Azar, David Müller and Charline Lasfargues were recipients of doctoral fellowships from ARC, La Ligue Nationale Contre le Cancer and CFP, respectively. Rodica Anesia was supported by the RITC foundation. We thank Dr Marlène Dufresne, Dr Véronique Gigoux and Mr Pascal Clerc for their help in characterising *Pdx1Cre-Kras^{G12D}* mice. We thank Professor Nahum Sonenberg for anti-eIF4G1 antibody and Dr Philippe Pierre for the anti-puromycin antibody.

Author contributions: YM and RA designed, performed and analysed the experiments, and wrote the report. DM, CL, SK and RA performed experiments and analysed the data. JP provided reagents. CB and SP designed and analysed experiments, and wrote the report.

REFERENCES

- 1 Sonenberg N, Hinnebusch AG. Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. *Cell* 2009; **136**: 731–745.
- 2 Blagden SP, Willis AE. The biological and therapeutic relevance of mRNA translation in cancer. *Nat Rev Clin Oncol* 2011; **8**: 280–291.
- 3 Waskiewicz AJ, Johnson JC, Penn B, Mahalingam M, Kimball SR, Cooper JA. Phosphorylation of the cap-binding protein eukaryotic translation initiation factor 4E by protein kinase Mnk1 *in vivo*. *Mol Cell Biol* 1999; **19**: 1871–1880.
- 4 Pyronnet S, Imataka H, Gingras AC, Fukunaga R, Hunter T, Sonenberg N. Human eukaryotic translation initiation factor 4G (eIF4G) recruits mnk1 to phosphorylate eIF4E. *EMBO J* 1999; **18**: 270–279.
- 5 Furic L, Rong L, Larsson O, Koumakpayi IH, Yoshida K, Brueschke A *et al*. eIF4E phosphorylation promotes tumorigenesis and is associated with prostate cancer progression. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; **107**: 14134–14139.
- 6 Ueda T, Sasaki M, Elia AJ, Chio IL, Hamada K, Fukunaga R *et al*. Combined deficiency for MAP kinase-interacting kinase 1 and 2 (Mnk1 and Mnk2) delays tumor development. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; **107**: 13984–13990.
- 7 Martineau Y, Azar R, Bousquet C, Pyronnet S. Anti-oncogenic potential of the eIF4E-binding proteins. *Oncogene* 2013; **32**: 671–677.
- 8 Wander SA, Hennessy BT, Slingerland JM. Next-generation mTOR inhibitors in clinical oncology: how pathway complexity informs therapeutic strategy. *J Clin Invest* 2011; **121**: 1231–1241.
- 9 Wolpin BM, Hezel AF, Abrams T, Blaszkowsky LS, Meyerhardt JA, Chan JA *et al*. Oral mTOR inhibitor everolimus in patients with gemcitabine-refractory metastatic pancreatic cancer. *J Clin Oncol* 2009; **27**: 193–198.
- 10 Hidalgo M. Pancreatic cancer. *N Engl J Med* 2010; **362**: 1605–1617.
- 11 Bragado MJ, Tashiro M, Williams JA. Regulation of the initiation of pancreatic digestive enzyme protein synthesis by cholecystokinin in rat pancreas *in vivo*. *Gastroenterology* 2000; **119**: 1731–1739.
- 12 Sans MD, Tashiro M, Vogel NL, Kimball SR, D'Alecy LG, Williams JA. Leucine activates pancreatic translational machinery in rats and mice through mTOR independently of CCK and insulin. *J Nutr* 2006; **136**: 1792–1799.
- 13 Tsukiyama-Kohara K, Poulin F, Kohara M, DeMaria CT, Cheng A, Wu Z *et al*. Adipose tissue reduction in mice lacking the translational inhibitor 4E-BP1. *Nat Med* 2001; **7**: 1128–1132.
- 14 Tsukiyama-Kohara K, Vidal SM, Gingras AC, Glover TW, Hanash SM, Heng H *et al*. Tissue distribution, genomic structure, and chromosome mapping of mouse and human eukaryotic initiation factor 4E-binding proteins 1 and 2. *Genomics* 1996; **38**: 353–363.
- 15 Morris JPt, Wang SC, Hebrok M. KRAS, Hedgehog, Wnt and the twisted developmental biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nat Rev Cancer* 2010; **10**: 683–695.
- 16 Pin CL, Rukstalis JM, Johnson C, Konieczny SF. The bHLH transcription factor Mist1 is required to maintain exocrine pancreas cell organization and acinar cell identity. *J Cell Biol* 2001; **155**: 519–530.
- 17 Bidinosti M, Ran I, Sanchez-Carbente MR, Martineau Y, Gingras AC, Gkogkas C *et al*. Postnatal deamidation of 4E-BP2 in brain enhances its association with raptor and alters kinetics of excitatory synaptic transmission. *Mol cell* 2010; **37**: 797–808.
- 18 Adesso L, Calabretta S, Barbagallo F, Capurso G, Pillozzi E, Geremia R *et al*. Gemcitabine triggers a pro-survival response in pancreatic cancer cells through activation of the MNK2/eIF4E pathway. *Oncogene* 2013; **32**: 2848–2857.
- 19 Azar R, Alard A, Susini C, Bousquet C, Pyronnet S. 4E-BP1 is a target of Smad4 essential for TGFbeta-mediated inhibition of cell proliferation. *EMBO J* 2009; **28**: 3514–3522.
- 20 Feldman ME, Apsel B, Uotila A, Loewith R, Knight ZA, Ruggero D *et al*. Active-site inhibitors of mTOR target rapamycin-resistant outputs of mTORC1 and mTORC2. *PLoS Biol* 2009; **7**: e38.
- 21 Schmidt EK, Clavarino G, Ceppi M, Pierre P. SUNSET, a nonradioactive method to monitor protein synthesis. *Nat Methods* 2009; **6**: 275–277.
- 22 Averous J, Fonseca BD, Proud CG. Regulation of cyclin D1 expression by mTORC1 signaling requires eukaryotic initiation factor 4E-binding protein 1. *Oncogene* 2008; **27**: 1106–1113.
- 23 Topisirovic I, Ruiz-Gutierrez M, Borden KL. Phosphorylation of the eukaryotic translation initiation factor eIF4E contributes to its transformation and mRNA transport activities. *Cancer Res* 2004; **64**: 8639–8642.
- 24 Cencic R, Desforges M, Hall DR, Kozakov D, Du Y, Min J *et al*. Blocking eIF4E-eIF4G Interaction as a Strategy To Impair Coronavirus Replication. *J Virol* 2011; **85**: 6381–6389.
- 25 Biankin AV, Waddell N, Kassahn KS, Gingras MC, Muthuswamy LB, Johns AL *et al*. Pancreatic cancer genomes reveal aberrations in axon guidance pathway genes. *Nature* 2012; **491**: 399–405.
- 26 Armengol G, Rojo F, Castellvi J, Iglesias C, Cuatrecasas M, Pons B *et al*. 4E-binding protein 1: a key molecular 'funnel factor' in human cancer with clinical implications. *Cancer Res* 2007; **67**: 7551–7555.
- 27 O'Reilly KE, Warycha M, Davies MA, Rodrik V, Zhou XK, Yee H *et al*. Phosphorylated 4E-BP1 is associated with poor survival in melanoma. *Clin Cancer Res* 2009; **15**: 2872–2878.
- 28 Rojo F, Najera L, Lirola J, Jimenez J, Guzman M, Sabadell MD *et al*. 4E-binding protein 1, a cell signaling hallmark in breast cancer that correlates with pathologic grade and prognosis. *Clin Cancer Res* 2007; **13**: 81–89.
- 29 Alain T, Morita M, Fonseca BD, Yanagiya A, Siddiqui N, Bhat M *et al*. eIF4E/4E-BP ratio predicts the efficacy of mTOR targeted therapies. *Cancer Res* 2012; **72**: 6468–6476.
- 30 Cencic R, Hall DR, Robert F, Du Y, Min J, Li L *et al*. Reversing chemoresistance by small molecule inhibition of the translation initiation complex eIF4F. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; **108**: 1046–1051.
- 31 Dowling RJ, Topisirovic I, Alain T, Bidinosti M, Fonseca BD, Petroulakis E *et al*. mTORC1-mediated cell proliferation, but not cell growth, controlled by the 4E-BPs. *Science (New York, NY)* 2010; **328**: 1172–1176.
- 32 Mamane Y, Petroulakis E, Martineau Y, Sato TA, Larsson O, Rajasekhar VK *et al*. Epigenetic activation of a subset of mRNAs by eIF4E explains its effects on cell proliferation. *PLoS ONE* 2007; **2**: e242.

Supplementary Information accompanies this paper on the Oncogene website (<http://www.nature.com/onc>)

Supplementary Figure Legends

Supplementary Figure 1: 4E-BP1 and SMAD4 IHC in normal and PDAC human samples. 4E-BP1 and SMAD4 expressions in sections of normal pancreas and PDAC samples were assessed by IHC. **White arrows:** acini; **black arrows:** ducts

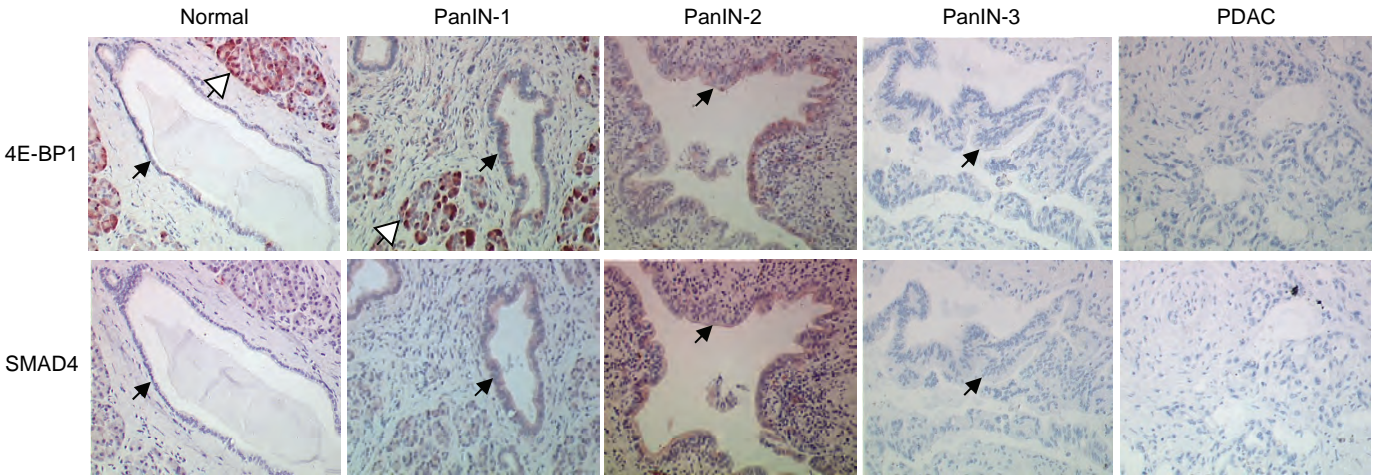
Supplementary Figure 2: 4E-BP1 and Ki67 IHC and H&E staining in nude mice tumours. MiaPaca-2 cells expressing inducible miRNeg or miRBP1 were implanted in nude mice and left grown for 3 weeks. Mice were then treated with doxycycline for 5 weeks and tumours were collected, paraffin-embedded and subjected to 4E-BP1 and Ki67 IHC and H&E staining.

Supplementary Table1: 4E-BP1 and SMAD4 levels in normal and PDAC human samples. 4E-BP1 and SMAD4 expression in sections of normal pancreas and PDAC samples was assessed by immunohistochemistry. Code: +++: high expression; ++: moderate expression; +: low expression; -: no expression (undetectable).

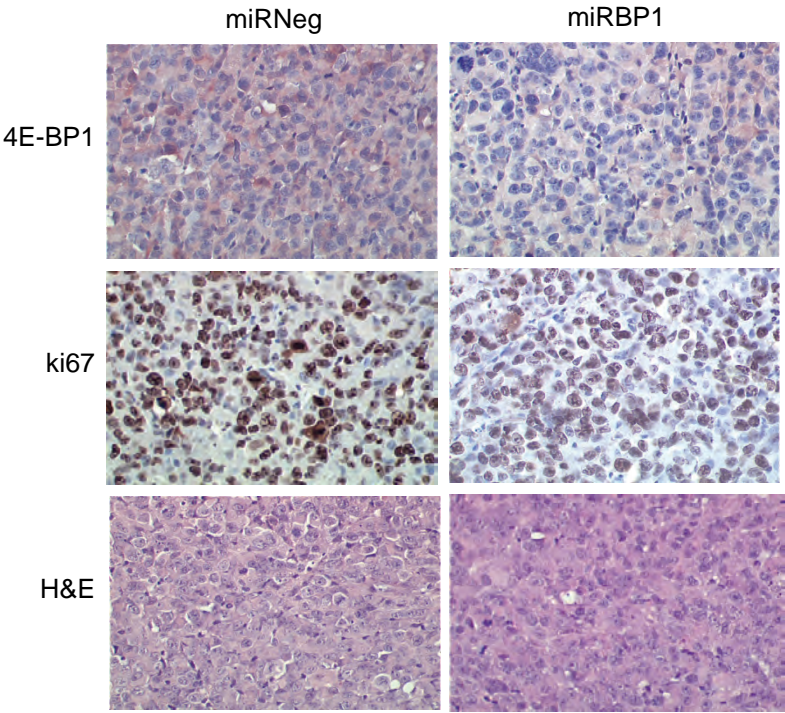
Supplementary Table2: Genetic profiles of different pancreatic cancer cell lines.

wt; wild-type; hd; homozygous deletion; mut: mutated; loh: loss of heterozygotia. Gene statuses common to MiaPaca-2 and Panc-1 cells are highlighted in grey.

Supplementary Figure 1



Supplementary Figure 2



Supplementary Table 1

Sample	Sex	Age	4E-BP1		SMAD4	
			acini	ducts	acini	ducts
Normal	F	57	+++	+	++	+
	M	60	+++	+	++	+
	M	51	+++	+	++	+
PDAC	M	67	+++		++	
	M	53	+++		++	
	F	58	+++		++	
	F	44	++		+	
	M	62	++		+	
	M	68	++		+	
	F	69	++		+	
	M	66	++		+	
	M	43	+		+	
	F	62	-		-	
	M	45	-		-	
	M	67	-		-	
	M	72	-		-	
	F	66	-		-	
	M	52	-		-	
	F	75	-		-	
	M	73	-		-	

Supplementary Table 2

	KRAS	P16 ^{INK4}	TP53	Smad4
BxPC-3	wt	hd	mut	hd
Capan-1	mut	hd	mut	loh+mut
Capan-2	mut	mut	wt	loh
MiaPaca-2	mut	hd	mut	wt
Panc-1	mut	hd	mut	wt

Les 4E-BPs perturbent la phosphorylation d'eIF4E

Une marque récurrente de la dérégulation de la traduction est la phosphorylation de l'oncogène eIF4E, impliquée dans la transformation tumorale et la synthèse d'effecteurs pro-oncogéniques (Furic et al. 2010; Robichaud et al. 2014). Cette phosphorylation est catalysée par les MNKs (**figure 19**), mais requiert leur liaison à la protéine d'échafaudage eIF4G au niveau de la coiffe (Pyronnet et al. 1999). La faculté des 4E-BPs à créer un complexe eIF4E-4E-BP exclusif de l'association eIF4E-eIF4G souligne leur potentiel à inhiber le recrutement des MNKs et la phosphorylation consécutive d'eIF4E. Ainsi en absence des 4E-BPs, le complexe eIF4E-eIF4G-MNK devrait être grandement stabilisé et la phosphorylation d'eIF4E augmentée. Si cet argument joue en faveur d'un rôle suppresseur de tumeur des 4E-BPs, aucune démonstration n'a été réalisée dans ce sens.

La publication d'un article dans la revue *Translation* (1^{er} auteur) nous a permis d'établir la preuve moléculaire que les 4E-BPs sont les principales régulatrices de la phosphorylation d'eIF4E, indépendamment du niveau d'expression des MNKs (Müller et al. 2013). Ces données prennent tout leur sens dans le contexte de l'adénocarcinome pancréatique puisque la perte de 4E-BP1 est corrélée à une hyperphosphorylation d'eIF4E dans les tumeurs humaines (Martineau, Azar, Müller, et al. 2013).

4E-BP restrains eIF4E phosphorylation

David Müller,¹ Charline Lasfargues,¹ Sally El Khawand,¹ Amandine Alard,²
Robert J Schneider,² Corinne Bousquet,¹ Stéphane Pyronnet^{1,*} and Yvan Martineau^{1,*}

¹INSERM UMR-1037; Toulouse University; Cancer Research Center of Toulouse (CRCT); Equipe Labellisée Ligue Contre le Cancer and Laboratoire d'Excellence Toulouse Cancer (TOUCAN); Toulouse, France; ²New York University School of Medicine; New York, NY USA

Keywords: eIF4E, 4E-BP1, 4E-BP2, MNK1, MNK2, phosphorylation, mTOR

Abbreviations: MNK, MAPK-interacting protein kinase; eIF4E, eukaryotic translation initiation factor 4E; 4E-BP, eIF4E-binding protein.

In eukaryotes, mRNA translation is dependent on the cap-binding protein eIF4E. Through its simultaneous interaction with the mRNA cap structure and with the ribosome-associated eIF4G adaptor protein, eIF4E physically posits the ribosome at the 5' extremity of capped mRNA. eIF4E activity is regulated by phosphorylation on a unique site by the eIF4G-associated kinase MNK. eIF4E assembly with the eIF4G-MNK sub-complex can be however antagonized by the hypophosphorylated forms of eIF4E-binding protein (4E-BP). We show here that eIF4E phosphorylation is dramatically affected by disruption of eIF4E-eIF4G interaction, independently of changes in MNK expression. eIF4E phosphorylation is actually strongly downregulated upon eIF4G shutdown or upon sequestration by hypophosphorylated 4E-BP, consequent to mTOR inhibition. Downregulation of 4E-BP renders eIF4E phosphorylation insensitive to mTOR inhibition. These data highlight the important role of 4E-BP in regulating eIF4E phosphorylation independently of changes in MNK expression.

Introduction

In eukaryotes, capped mRNAs can interact with the cap-binding protein eIF4E (eukaryotic (translation) initiation factor 4E).¹ Different functions have been assigned to eIF4E including a role in mRNA transport, degradation or translation into proteins.² The translational function of eIF4E is the target of different mechanisms of regulation. eIF4E indeed interacts with the translation stimulatory proteins eIF4GI or eIF4GII (hereafter indifferently referred as eIF4G), or with different inhibitors of translation such as the eIF4E-binding protein 1 (4E-BP1) or 4E-BP2 (hereafter indifferently referred as 4E-BP).³ In addition to these regulatory interactions, eIF4E activity is also controlled by phosphorylation on a unique site (S209 in the human sequence). Through its role in the stimulation of protein synthesis, eIF4E has been implicated in tumorigenesis,⁴ and S209 phosphorylation has been shown to be required for eIF4E's oncogenic potential.^{5,6} The S209 residue is phosphorylated mainly by the MAPK-interacting protein kinase 1 (MNK1) or MNK2 (hereafter indifferently referred as MNK).⁷ Consistently, the deficiency of both MNK1 and MNK2 kinases delays tumor progression.⁸ Interestingly, S209 phosphorylation appears facilitated when eIF4E is bound to eIF4G. Indeed, the N-terminal end of MNK interacts with the C-terminal

extremity of eIF4G.⁹ Therefore, the simultaneous binding of eIF4E and MNK to their common partner eIF4G facilitates eIF4E phosphorylation by MNK.¹⁰ These characteristics suggest that the control of eIF4E phosphorylation may not strictly depends on changes in MNK expression and/or activity, but also on changes in the interaction between eIF4E and the eIF4G-MNK sub-complex, an interaction itself modulated by 4E-BP.

4E-BP inhibits translation initiation by competing with eIF4G for a common binding site on eIF4E.¹¹ Consistently, overexpression of 4E-BP prevents eIF4E-induced tumorigenesis.^{12,13} The interaction of 4E-BP with eIF4E is however precluded when 4E-BP is phosphorylated by mTOR,¹⁴ a kinase which lies downstream of the growth-factor-dependent PI3K/AKT pathway. mTOR is also a sensor of amino-acid availability. Upon amino-acid starvation (or under treatment with mTOR inhibitors), 4E-BP is no longer phosphorylated, sequesters eIF4E and inhibits protein synthesis. It can be therefore anticipated that eIF4E sequestration by 4E-BP and consequent eviction of the eIF4G-MNK sub-complex negatively impinges upon eIF4E phosphorylation, independently of changes in MNK status. This is supported by the findings that tumorigenesis induced after homozygous deletion of *Pten*, a tumor suppressor gene that prevents 4E-BP phosphorylation through inhibition of the PI3K/AKT/mTOR pathway, appears

*Correspondence to: Stéphane Pyronnet, Email: stephane.pyronnet@inserm.fr and Yvan Martineau, Email: yvan.martineau@inserm.fr

Submitted: 03/08/2013; Revised: 07/18/2013; Accepted: 07/19/2013

Citation: Müller D, Lasfargues C, Khawand SE, Alard A, Schneider RJ, Bousquet C, Pyronnet S, Martineau Y. 4E-BP restrains eIF4E phosphorylation. Translation 2013; 1: e25819; <http://dx.doi.org/10.4161/trla.25819>

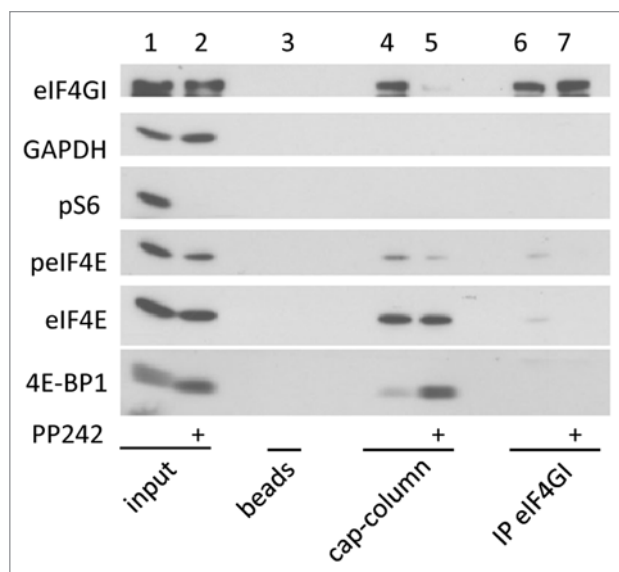


Figure 1. eIF4E and 4E-BP1 are dephosphorylated upon mTOR inhibition by PP242. HeLa cells were treated with 2.5 μ M of PP242 for 1 h or left untreated. Whole cell lysates were incubated with m⁷GTP-beads (cap column), beads alone (beads) or subjected to immunoprecipitation with eIF4GI antibody (IP eIF4GI). Bound proteins and whole cell lysates (input) were separated by SDS-PAGE and analyzed by western blotting with the indicated antibodies. Data are representative of at least three independent experiments.

strongly dependent on eIF4E phosphorylation.⁸ To address this question directly, we have here compared the capacity of eIF4E to be (de)phosphorylated in different cell types upon manipulation of eIF4E-eIF4G-MNK complex assembly by targeting 4E-BP (mTOR inhibition, shRNAs or knockout mice), eIF4G (shRNAs) or MNK (shRNAs or pharmacological inhibitors).

Results and Discussion

One observation that led us to investigate the potential role of 4E-BP in eIF4E phosphorylation is that, in addition to hypophosphorylation of 4E-BP, mTOR inactivation by its specific inhibitor PP242 impairs eIF4E phosphorylation (Fig. 1, lanes 1 and 2; and Furic et al.⁶). Yet, eIF4E is not a substrate of mTOR. However, the functional consequence of 4E-BP hypophosphorylation upon PP242-mediated mTOR inactivation is the binding of eIF4E to 4E-BP instead of eIF4G, as visualized by a cap-column assay (lanes 3–5) or by eIF4G immunoprecipitation (lanes 6 and 7). Because the eIF4E kinase MNK is associated with eIF4G, MNK is also separated from its substrate eIF4E.¹⁰ We therefore hypothesized that eviction of the eIF4G-MNK sub-complex due to eIF4E sequestration by the hypophosphorylated forms of 4E-BP was responsible for the inhibition of eIF4E phosphorylation upon mTOR inactivation. To explore this hypothesis, we first looked at eIF4E phosphorylation status in proliferating HEK cells (i.e., in the presence of 10% fetal calf serum or FCS) where 4E-BP1 and/or 4E-BP2 expression has been downregulated

by specific shRNAs. No significant changes in the level of eIF4E phosphorylation were detected upon downregulation of either 4E-BP1 or 4E-BP2 or both (Fig. 2A left). In these conditions however eIF4E phosphorylation appeared not affected probably because, in the presence of FCS, 4E-BP1 and 4E-BP2 are hyperphosphorylated and are therefore not expected to sequester eIF4E. Consistently, when the experiment was reproduced in the presence of the mTOR inhibitor PP242, the impairment of eIF4E phosphorylation following mTOR inhibition was much less marked when 4E-BP1 or 4E-BP2 or both proteins were downregulated (Fig. 2A right). The use of specific shRNAs in HEK cells did not permit a full extinction of 4E-BP1 or 4E-BP2 expression. We therefore checked the status of eIF4E phosphorylation in proliferating mouse embryonic fibroblasts (MEFs) where the two *4e-bp1* and *2* loci are ablated (hereafter named 4E-BP DKO MEFs). The levels of eIF4E phosphorylation appeared to be similar in 4E-BP DKO MEFs and in wild-type (WT) MEFs (Fig. 2B, lanes 1 and 3). However, as described above for HEK cells, when the phosphorylation of 4E-BP was blocked by PP242-mediated inhibition of mTOR, eIF4E phosphorylation remained unchanged in 4E-BP DKO MEFs but was dramatically decreased in WT MEFs (Fig. 2B, lanes 2 and 4). These data indicated that impairment of eIF4E phosphorylation upon mTOR inactivation (by PP242) occurs solely when cells express 4E-BP1 and/or 4E-BP2, suggesting a crucial role of eIF4E/eIF4G interaction in the regulation of eIF4E phosphorylation. To directly test this hypothesis, we then monitored the effect of eIF4GI and/or eIF4GII extinction on eIF4E phosphorylation. The use of a combination of doxycycline-inducible shRNAs targeting eIF4GI and/or eIF4GII revealed different contributions of eIF4GI and eIF4GII in the extent of eIF4E phosphorylation. Extinction of eIF4GI strongly decreased eIF4E phosphorylation (Fig. 2C, lanes 1 and 2) whereas extinction of eIF4GII had no effect (lanes 1 and 3) presumably because eIF4GII amount in mammalian cells is much lower than that of eIF4GI.¹⁵ A similar effect on eIF4E phosphorylation was obtained upon knockdown of both eIF4GI and eIF4GII compared with eIF4GI silencing alone (Fig. 2C, lanes 2 and 4).

In the experiments described above, the inhibitory role of 4E-BP or the stimulatory role of eIF4G on eIF4E phosphorylation was observed using artificial manipulations of 4E-BP or eIF4G cellular contents (shRNAs or KO mice). We have therefore analyzed the regulation of eIF4E phosphorylation in transformed cells which naturally express different levels of 4E-BP. MiaPaca-2 and Panc-1 pancreatic cancer cells were chosen because they do not express 4E-BP2, as compared to HEK cells. Panc-1 cells express much less 4E-BP1 than MiaPaca-2 and both contain comparable amounts of eIF4E, eIF4GI and MNK1, while MNK2 is not detectable (Fig. 3A). Consistently with the observations made in Figure 2, the extent of eIF4E phosphorylation (lower in MiaPaca-2 than in Panc-1 cells) was inversely correlated to the cellular content of 4E-BP1 (higher in MiaPaca-2 than in Panc-1 cells) (Fig. 3A). Also, inhibition of eIF4E phosphorylation by PP242-mediated inactivation of mTOR occurred in MiaPaca-2 cells expressing 4E-BP1

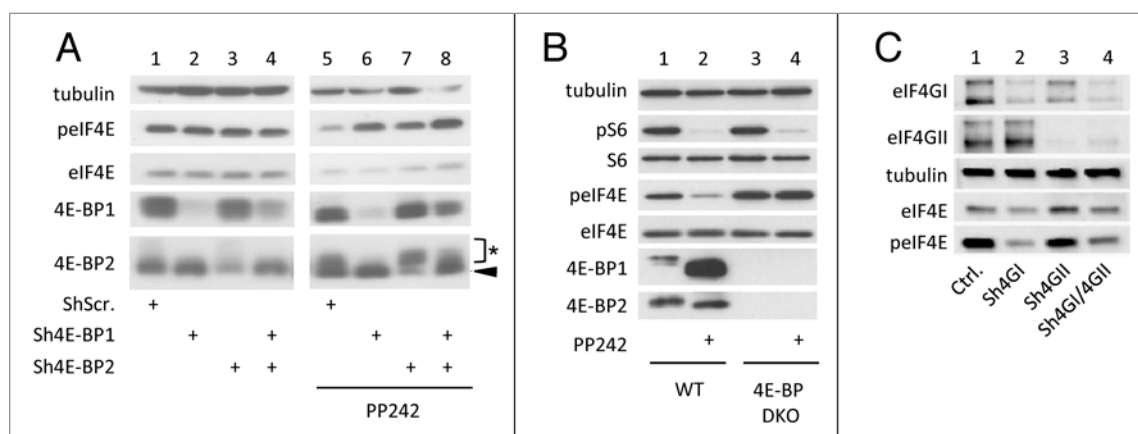


Figure 2. eIF4E phosphorylation is favored by 4E-BP downregulation but hindered by eIF4G silencing. (A) HEK cells expressing shRNA against 4E-BP1 and/or 4E-BP2 or scramble shRNA were treated with 2.5 μ M of PP242 for 1 h or left untreated in the presence of 10% FCS. Black arrowhead indicates 4E-BP2 specific signal. Asterisk shows non-specific signal from dephosphorylated 4E-BP1. (B) 4E-BP1/4E-BP2 double knockout (4E-BP DKO) and wild type (WT) mouse embryonic fibroblasts were treated as in (A). (C) MDA-MB231 cells expressing inducible sh-miRNA against eIF4GI and/or eIF4GII or control vector were grown with 5 μ g/ml doxycycline for 3 d. Cell lysates were analyzed by western blotting using the indicated antibodies. Data are representative of at least three independent experiments.

(Fig. 3B, lanes 1 and 2) but not in Panc-1 cells poorly expressing 4E-BP1 (Fig. 3B, lanes 3 and 4). Thus, alterations in eIF4E S209 phosphorylation consequent to the sole destruction of eIF4E-eIF4G interaction appeared dependent on eIF4E accessibility to its kinase MNK. To further explore this hypothesis, the relative importance of 4E-BP to that of MNK activity or expression level in eIF4E phosphorylation was examined by manipulating MNK activity or expression using pharmacological inhibitors or specific shRNA.

At least two potent inhibitors of MNK activity have been described: CGP57380 and cercosporamide (Reviewed in Hou et al.¹⁶). In our hands, we found that CGP57380 used at 20 μ M was sufficient to completely abrogate eIF4E phosphorylation independently of changes in 4E-BP1 level or phosphorylation (Fig. 4A, lanes 1–3), and was more potent than cercosporamide used at similar concentrations (lanes 4–5). Furthermore, treatment with cercosporamide increased 4E-BP1 phosphorylation in HEK cells, a side effect which could favor eIF4E accessibility to eIF4G thus rendering subsequent conclusions difficult. Overall, the data obtained in HEK cells where 4E-BP1 and/or 4E-BP2 expression has been diminished by specific shRNAs (Fig. 4B), those obtained in WT or 4E-BP DKO MEFs (Fig. 4C, lanes 1, 3, 4 and 6) or those obtained in pancreatic cancer cell lines (MiaPaca-2 and Panc-1; Figure 4D, lanes 1, 2, 5, 6) revealed that eIF4E phosphorylation is actually sensitive to CGP57380, thus indicating that MNK1 and/or MNK2 remain the major kinases

of eIF4E in these conditions. However, these data also revealed that sensitivity of eIF4E phosphorylation to the MNK inhibitor CGP57380 is dependent on 4E-BP1 and/or 4E-BP2 levels. Indeed, eIF4E dephosphorylation upon inhibition of MNK activity was less marked in HEK cells expressing lower levels of 4E-BP1 and 4E-BP2 (Fig. 4B), in 4E-BP DKO MEFs (Fig. 4C, lanes 3 and 6) and in Panc-1 cells expressing low levels of 4E-BP1 (and devoid of 4E-BP2; Figure 4D, lanes 2 and 6). This observation further supports the notion that eIF4E is efficiently phosphorylated when fully accessible and not sequestered by

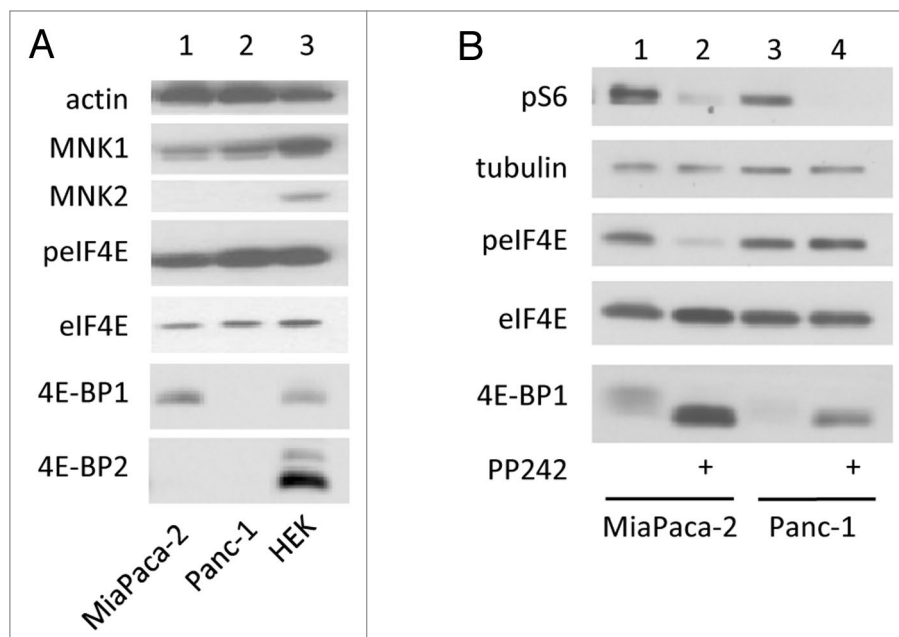


Figure 3. Low amount of 4E-BP favors eIF4E phosphorylation. (A) MiaPaca-2, Panc-1 and HEK cells lysates were analyzed by western blotting. (B) MiaPaca-2, Panc-1 were treated with 2.5 μ M of PP242 for 1 h. Cell lysates were analyzed by western blotting using the indicated antibodies. Data are representative of at least three independent experiments.

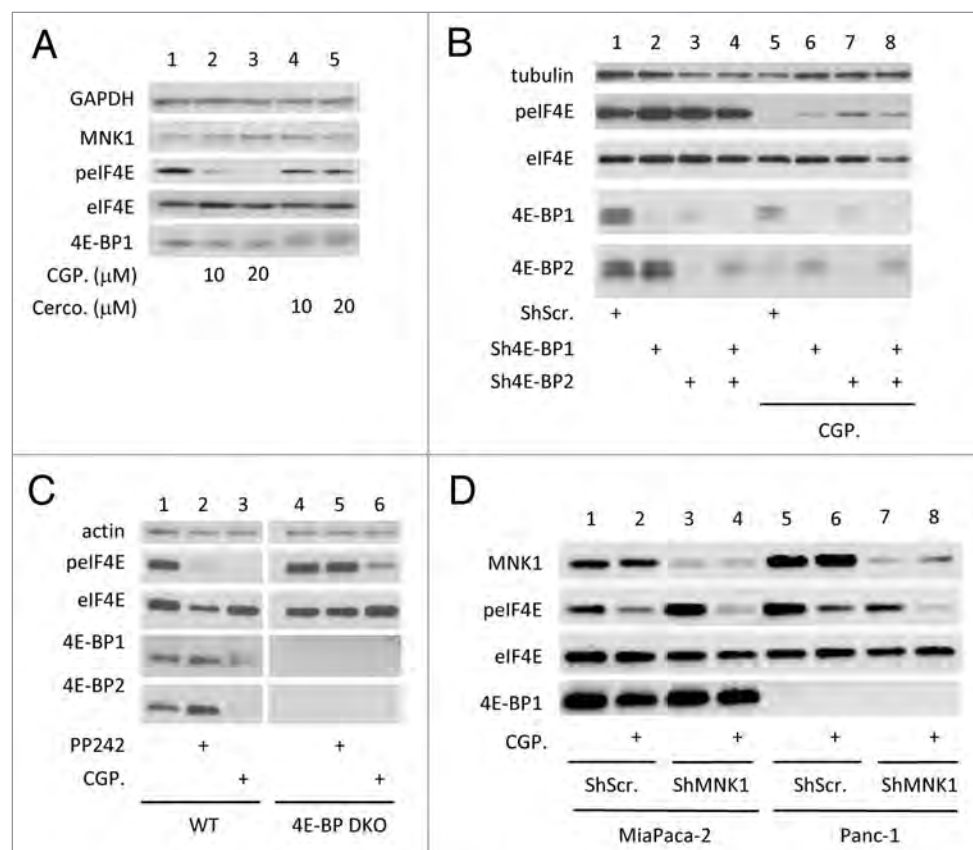


Figure 4. 4E-BP downregulation does not confer resistance to the MNK inhibitor CGP57380. (A) HEK cells were treated for 1 h with 10 or 20 μ M of CGP57380 (CGP) or cercosporamide (Cerc.) or left untreated. (B) HEK cells expressing shRNA against 4E-BP1 and/or 4E-BP2 or scramble shRNA were treated with 20 μ M of CGP57380 (CGP) for 1 h or left untreated. (C) 4E-BP DKO and WT MEF were treated with 2.5 μ M of PP242 or with 20 μ M of CGP57380 for 1 h or left untreated. (D) MiaPaca-2 and Panc-1 cells expressing shRNA against the 3'UTR of MNK1 mRNA or scramble shRNA were treated with 20 μ M of CGP for 1 h prior harvesting. Cell lysates were analyzed by western blotting using the indicated antibodies. Data are representative of at least three independent experiments.

4E-BP. We also revealed that, in the presence of 4E-BP1 and 4E-BP2 (WT MEFs), PP242-mediated inhibition of mTOR activity was nearly as efficient as CGP57380-mediated inhibition of MNK activity in preventing eIF4E phosphorylation (Fig. 4C, lanes 2 and 3). This suggests that MNK access to eIF4E limits the latter phosphorylation. Nonetheless, limited MNK expression could also participate to these observations. To address this question, we altered MNK expression using shRNA. In MNK1 and MNK2 double knockout mice, eIF4E is not phosphorylated at all.¹⁷ We therefore anticipated that MNK1 extinction using specific shRNAs in pancreatic cancer cells (combined with the absence of MNK2 in these cells) should be sufficient to impair eIF4E phosphorylation. Surprisingly however, moderate changes in the extent of eIF4E phosphorylation could be detected upon severe downregulation of MNK1 expression in both MiaPaca-2 and Panc-1 cells (Fig. 4D, lanes 1, 3, 5 and 7). In contrast, CGP57380-mediated inhibition of MNK1 strongly inhibited eIF4E phosphorylation (Fig. 4D, lanes 2, 4, 6 and 8) demonstrating that MNK1 is present in large excess and is not limiting for eIF4E phosphorylation.

Finally, we have verified whether the observations made above could also be visualized in a more physiological situation. The data showing that pharmacological inhibition of mTOR (PP242-treatment of MEFs) indirectly impinges upon eIF4E phosphorylation through its sequestration by hypophosphorylated 4E-BPs were reproduced when cells were exposed to low concentrations of serum (FCS) or deprivation in amino-acids (AA). eIF4E phosphorylation was indeed much more inhibited under low concentrations of FCS or AA deprivation when MEFs express 4E-BP1 and 4E-BP2 (Fig. 5A). Similarly, we found that in MiaPaca-2 cells expressing shRNA to 4E-BP1 (Fig. 5B) or in HEK cells where 4E-BP1 and/or 4E-BP2 expression has been diminished by specific shRNAs (Fig. 5C), eIF4E phosphorylation was resistant to amino-acid starvation. Thus, combined with the observations that eIF4E phosphorylation is higher in pancreatic cancer cells poorly expressing 4E-BP1 and 4E-BP2, these important results indicate that in the absence of 4E-BP, eIF4E phosphorylation becomes constitutive and no longer modulated by serum or amino-acid

deprivation.

In summary, these results highlight the important role played by 4E-BP interaction with eIF4E in the control of eIF4E phosphorylation. They also reveal that the intracellular amounts of MNK1 and MNK2 are not limiting (at least in HEK, MEF and pancreatic cancer cells), but rather that MNK accessibility to eIF4E, through concomitant binding of MNK and eIF4E to eIF4G, plays a prominent role in the regulation of eIF4E phosphorylation. Conversely, restricting access to eIF4E via 4E-BP appears to limit the phosphorylation of the cap-binding protein. As eIF4E phosphorylation promotes tumorigenesis, this finding also emphasizes the anti-oncogenic potential of 4E-BP.³

Materials and Methods

Reagents

Antibodies used were as follows: Anti-eIF4GI, anti-eIF4GII were obtained from Dr. N. Sonenberg (McGill University, Montreal, Canada). Anti-eIF4E, 4E-BP1 (9452), 4E-BP2, MNK1 and phospho-S240–244 RPS6 (pS6) were from Cell

Signaling Technology. Anti-RPS6 (S6), GAPDH and MNK2 were from Santa Cruz. Anti-phospho-S209-eIF4E (peIF4E) was from Epitomics. Anti- β -tubulin and β -actin were from Sigma-Aldrich. Protein G Sepharose for fast flow and 7-methyl GTP Sepharose 4B were from GE healthcare. Doxycycline, puromycin, gentamicin, CGP57380 and PP242 were from Sigma-Aldrich and Cercosporamide from Santa-Cruz.

Cell culture

HeLa S3 and HEK 293 cells were obtained from the American Tissue Culture Collection and maintained in Dulbecco's minimum essential medium (DMEM, Lonza) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS, Lonza) and 5 U/ml penicillin-streptomycin (Lonza) in 5% CO₂.

Panc-1, MiaPaca-2 pancreatic cancer cell lines and MiaPaca-2 cells expressing shRNA to 4E-BP1 and Non-Target shRNA (scramble) were cultured as previously described.¹⁸ shRNA vector accession numbers are: 4E-BP1 TRCN0000040203, 4E-BP2 TRCN0000117814, MNK1 TRCN0000195343 and Non-Target shRNA Control (scramble) SHC002. MDA-MB231 cells expressing inducible sh-miRNA were obtained by lentiviral transduction of pTRIPZ vectors (Open Biosystems). Targeting sequences were as follows sh4G1mir1: GTAGTGTGATGTGTCTGAAC, sh4G2mir1: AAGTTTCACGTCTTCGCCAAT, non-silencing (Ctrl.): AATTCTCCGAACGTGTCACGT. 4E-BP1/4E-BP2 double knockout (DKO) and wild type (WT) mouse embryonic fibroblasts (MEFs) were obtained from Dr. N. Sonenberg (McGill University, Montreal, Canada). Cells were amino acid-starved for 1 h using HBSS with calcium and magnesium supplemented with 4.5 g/l glucose (Lonza).

Cap-column and immunoprecipitation

HeLa S3 cells were seeded in 150 mm plates and treated with a vehicle (DMSO) or PP242 (2.5 μ M) for 1 h. Cells were then washed with cold PBS, collected, and lysed in buffer A containing 40 mM HEPES-KOH (pH 7.5), 120 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.1 mM GDP and 10 mM pyrophosphate, 50 mM NaF, and 0.3% CHAPS supplemented with protease and phosphatase inhibitors (as described in¹⁹). Cell extracts were transferred onto 7-methyl GTP Sepharose 4B or protein G-Sepharose beads supplemented or not with anti-eIF4GI antibody, and incubated for 2 h at 4°C. Beads were washed four times in buffer A. Bound proteins were eluted with Laemmli buffer and processed for western blotting.

SDS-PAGE and western blotting

Cells were harvested on ice, washed twice with cold PBS, and lysed in 50 mM TRIS-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% NP-40 supplemented with protease and phosphatase inhibitors. Protein concentration was measured using Protein Assay reagent (Bio-Rad), and equal amounts of proteins were subjected to SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membrane (BioTraceNT; Pall Corp). Membranes were washed in Tris Buffer Saline supplemented with 0.1% Tween 20 (TBS-T) then saturated in TBS-T with 5% non-fat dry milk, incubated overnight with primary antibodies in TBS-T with 5% BSA, washed and revealed according to Cell Signaling Technology protocol.

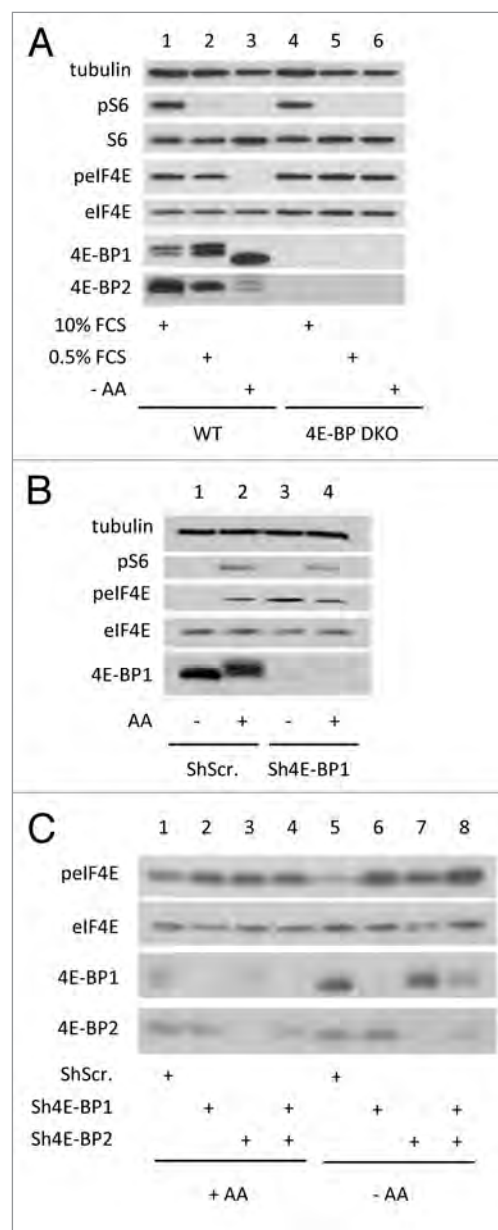


Figure 5. 4E-BPs downregulation renders eIF4E phosphorylation insensitive to serum or amino acids starvation. (A) 4E-BP DKO and WT MEF were incubated overnight in DMEM containing low serum concentration (0.5% FCS) or incubated for 1 h in amino acid-free HBSS medium or left untreated (10% FCS). (B) MiaPaca-2 cells expressing shRNA to 4E-BP1 or scramble shRNA were incubated for 2 h in amino acid-free HBSS medium or supplemented with 10% FCS and amino acids. Cell lysates were analyzed by western blotting using the indicated antibodies. (C) HEK cells expressing shRNA against 4E-BP1 and/or 4E-BP2 or scramble shRNA were incubated for 1 h in amino acid-free HBSS medium (-AA) or left untreated in the presence of 10% FCS (+AA). Data are representative of at least three independent experiments.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Acknowledgments

This work was supported by grants from INSERM-Université Paul Sabatier and from La Ligue to S. Pyronnet ("Comités de Hautes-Pyrénées et de Lot-et-Garonne"). Y. Martineau was a recipient of Fondation de France post-doctoral fellowship. D. Müller and C. Lasfargues were recipients of doctoral fellowships

from La Ligue Nationale Contre le Cancer. A. Alard was a recipient of a fellowship from the Association for Cancer Research (ARC). R.J. Schneider was supported by grants from the Breast Cancer Research Foundation, the Avon Foundation for Women and the US. Department of Defense Breast Cancer Research Program. We thank Prof. N. Sonenberg for WT and *4e-bp1*^{-/-}, *4e-bp2*^{-/-} MEFs, eIF4GI and eIF4GII antibodies.

References

1. Sonenberg N, Morgan MA, Merrick WC, Shatkin AJ. A polypeptide in eukaryotic initiation factors that crosslinks specifically to the 5'-terminal cap in mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1978; 75:4843-7; PMID:217002; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.75.10.4843>
2. von der Haar T, Gross JD, Wagner G, McCarthy JE. The mRNA cap-binding protein eIF4E in post-transcriptional gene expression. *Nat Struct Mol Biol* 2004; 11:503-11; PMID:15164008; <http://dx.doi.org/10.1038/nsmb779>
3. Martineau Y, Azar R, Bousquet C, Pyronnet S. Anti-oncogenic potential of the eIF4E-binding proteins. *Oncogene* 2013; 32:671-7; PMID:22508483; <http://dx.doi.org/10.1038/ncr.2012.116>
4. Lazaris-Karatzas A, Montine KS, Sonenberg N. Malignant transformation by a eukaryotic initiation factor subunit that binds to mRNA 5' cap. *Nature* 1990; 345:544-7; PMID:2348862; <http://dx.doi.org/10.1038/345544a0>
5. Wendel HG, Silva RL, Malina A, Mills JR, Zhu H, Ueda T, et al. Dissecting eIF4E action in tumorigenesis. *Genes Dev* 2007; 21:3232-7; PMID:18055695; <http://dx.doi.org/10.1101/gad.1604407>
6. Furic L, Rong L, Larsson O, Koumakpayi IH, Yoshida K, Brueschke A, et al. eIF4E phosphorylation promotes tumorigenesis and is associated with prostate cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107:14134-9; PMID:20679199; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1005320107>
7. Waskiewicz AJ, Flynn A, Proud CG, Cooper JA. Mitogen-activated protein kinases activate the serine/threonine kinases Mnk1 and Mnk2. *EMBO J* 1997; 16:1909-20; PMID:9155017; <http://dx.doi.org/10.1093/emboj/16.8.1909>
8. Ueda T, Sasaki M, Elia AJ, Chio II, Hamada K, Fukunaga R, et al. Combined deficiency for MAP kinase-interacting kinase 1 and 2 (Mnk1 and Mnk2) delays tumor development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107:13984-90; PMID:20679220; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1008136107>
9. Pyronnet S. Phosphorylation of the cap-binding protein eIF4E by the MAPK-activated protein kinase Mnk1. *Biochem Pharmacol* 2000; 60:1237-43; PMID:11007962; [http://dx.doi.org/10.1016/S0006-2952\(00\)00429-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0006-2952(00)00429-9)
10. Pyronnet S, Imataka H, Gingras AC, Fukunaga R, Hunter T, Sonenberg N. Human eukaryotic translation initiation factor 4G (eIF4G) recruits mnk1 to phosphorylate eIF4E. *EMBO J* 1999; 18:270-9; PMID:9878069; <http://dx.doi.org/10.1093/emboj/18.1.270>
11. Mader S, Lee H, Pause A, Sonenberg N. The translation initiation factor eIF-4E binds to a common motif shared by the translation factor eIF-4 gamma and the translational repressors 4E-binding proteins. *Mol Cell Biol* 1995; 15:4990-7; PMID:7651417
12. Hsieh AC, Costa M, Zollo O, Davis C, Feldman ME, Testa JR, et al. Genetic dissection of the oncogenic mTOR pathway reveals druggable addiction to translational control via 4EBP-eIF4E. *Cancer Cell* 2010; 17:249-61; PMID:20227039; <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2010.01.021>
13. She QB, Halilovic E, Ye Q, Zhen W, Shirasawa S, Sasazuki T, et al. 4E-BP1 is a key effector of the oncogenic activation of the AKT and ERK signaling pathways that integrates their function in tumors. *Cancer Cell* 2010; 18:39-51; PMID:20609351; <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2010.05.023>
14. Brunn GJ, Hudson CC, Sekulic A, Williams JM, Hosoi H, Houghton PJ, Lawrence JC, Jr., Abraham RT. Phosphorylation of the translational repressor PHAS-I by the mammalian target of rapamycin. *Science (New York, NY)* 1997; 277:99-101.
15. Svitkin YV, Gradi A, Imataka H, Morino S, Sonenberg N. Eukaryotic initiation factor 4GII (eIF4GII), but not eIF4GI, cleavage correlates with inhibition of host cell protein synthesis after human rhinovirus infection. *J Virol* 1999; 73:3467-72; PMID:10074204
16. Hou J, Lam F, Proud C, Wang S. Targeting Mnk1 for cancer therapy. *Oncotarget* 2012; 3:118-31; PMID:22392765
17. Ueda T, Watanabe-Fukunaga R, Fukuyama H, Nagata S, Fukunaga R. Mnk2 and Mnk1 are essential for constitutive and inducible phosphorylation of eukaryotic initiation factor 4E but not for cell growth or development. *Mol Cell Biol* 2004; 24:6539-49; PMID:15254222; <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.24.15.6539-6549.2004>
18. Martineau Y, Azar R, Müller D, Lasfargues C, El Khawand S, Anesia R, et al. Pancreatic tumours escape from translational control through 4E-BP1 loss. *Oncogene* 2013; PMID:23563181; <http://dx.doi.org/10.1038/ncr.2013.100>
19. Dowling RJ, Topisirovic I, Alain T, Bidinosti M, Fonseca BD, Petroulakis E, Wang X, Larsson O, Selvaraj A, Liu Y, Kozma SC, Thomas G, Sonenberg N. mTORC1-mediated cell proliferation, but not cell growth, controlled by the 4E-BPs. *Science (New York, NY)* 2010; 328:1172-6.

La perte du contrôle traductionnel exercé par 4E-BP1 favorise la réplication de l'ADN dans le cancer du pancréas

La perte de 4E-BP1 dans l'adénocarcinome pancréatique, tout comme l'hyperphosphorylation d'eIF4E, suggère que l'initiation de la traduction n'y est plus régulée et que de nombreux effecteurs oncogéniques sont continuellement synthétisés, principalement en raison de l'activation aberrante des voies convergeant sur mTORC1. Cette troisième partie se propose ainsi de répondre aux 3 questions suivantes :

- 1/ Quels sont les ARNm dont la traduction est favorisée par la perte de 4E-BP1 et s'agrent-ils en fonctions cellulaires particulières ?
- 2/ Ces fonctions sont-elles réellement exacerbées dans les cellules cancéreuses pancréatiques et quelle est leur contribution au développement tumoral et à la chimiorésistance ?
- 3/ La perte de 4E-BP1 précipite-t-elle le développement du cancer pancréatique *in vivo* ?

La réalisation de ce projet repose en grande partie sur l'analyse du traductome effectuée par la méthode de polysome profiling. A cette occasion, nous avons pu initier une collaboration avec le Dr. Ola Larsson et le Dr. Laia Masvidal du Karolinska Institutet (Solna, Suède). Leur expertise dans le domaine de l'analyse traductomique est appuyée par les nombreuses publications du Dr. Larsson, dont la création de l'algorithme ANOTA (Larsson 2010). Les données issues de l'hybridation sur puces leur ont donc été confiées, afin de procéder à la totalité de l'analyse bioinformatique.

L'ensemble des expériences *in vitro* a été réalisé dans la lignée cellulaire Miapaca-2, issue d'adénocarcinome pancréatique humain. Les expériences *in vivo* ont été réalisées dans le modèle murin 4E-BP1/2 double KO (Le Bacquer et al. 2007). Ces animaux nous ont été fournis par le Pr. Nahum Sonenberg de l'Université McGill (Montréal, Canada).

Ces résultats sont présentés sous la forme d'un article, prochainement soumis.

Loss of 4E-BP1-mediated translational control favors DNA replication in pancreatic cancer

David Müller¹, Théo Goullet de Rugy¹, Rémi Samain¹, Romain Baer¹, Laia Masvidal-Sanz², Fanny Grimal^{1,3}, Hervé Avet-Loiseau^{1,3}, Julie Guillermet-Guibert¹, Nahum Sonenberg⁴, Jean-Sébastien Hoffmann¹, Ola Larsson², Corinne Bousquet¹, Stéphane Pyronnet¹, Yvan Martineau¹.

¹ Cancer Research Center of Toulouse (CRCT), INSERM UMR 1037-University Toulouse III Paul Sabatier, Toulouse, France ;

² Department of Oncology-Pathology, Science for Life Laboratory, Karolinska Institutet, Solna, Sweden ;

³ Laboratory for Genomics in Myeloma, Institut Universitaire du Cancer and University Hospital, Toulouse ;

⁴ Department of Biochemistry and Goodman Cancer Research Centre, McGill University, Montreal, Quebec, Canada.

Correspondence should be addressed to Yvan Martineau (email : yvan.martineau@inserm.fr)

Abstract:

We recently showed that human PDAC (pancreatic ductal adenocarcinoma) and *Kras*-driven PDAC mouse models harbor an early loss of expression of the translational repressor 4E-BP1, suggesting a dysregulation of mRNA translation during PDAC development. To identify the subset of mRNAs whose translation is sensitive to this loss, we defined the 4E-BP1-dependent translome (genome-wide pools of translated mRNA) of pancreatic cancer cells. The most regulated genes were involved in DNA replication and repair, including *RRM2* and *CDC7*. Consistently, ablation of 4E-BP1 rendered S-phase entry insensitive to treatment with mTOR inhibitors and allowed efficient DNA replication. We also analyzed the sensitivity of 4E-BP1/2 KO animals to pancreatic cancer development. Upon cerulein stimulation, which causes pancreatitis and recapitulates pancreatic cancer initiation, 4E-BP1/2 deleted mice exhibited more metaplasia than their WT counterpart. However, pancreatic tissue regeneration was much faster in 4E-BP1/2 KO mice, attested by an increased proliferation rate (Ki67), but also a higher replicative stress (γ H2AX), corroborating our *in vitro* analysis. Our data provide evidence that 4E-BP1 loss favors DNA replication and repair, suggesting a link between translation dysregulation and resistance to gemcitabine in PDAC.

Introduction :

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) remains an incurable disease. Although some important progress has been made in patient care and combinatorial therapies, the 5-year survival rate has not significantly raised over the past two decades¹. Overall, PDAC has been remarkably resistant to most conventional therapeutic strategies including chemotherapy and radiotherapy². More recently, cancer immunotherapy trial (anti-CTLA-4) also revealed a low response rate of patients with pancreatic cancer³. Extensive “omics” approaches have been applied to pancreatic cancer to characterize driving and passenger mutations, as well as mRNA, lncRNA, miRNA, protein and epigenetic modification profiles^{4,5}. These analyses led to the discovery of multiple activated pathways and numerous compensatory signaling crosstalks. As a consequence, pancreatic cancer cells display an impressive adaptability either to the dense and fibrotic stromal environment or to therapeutic treatments. Yet, Achilles’ heel of pancreatic cancer remains to be identified.

A relatively unexplored aspect of PDAC lies in the control of mRNA translation which provides a quick and efficient adaptive response to environmental changes. Translational control is considered as a major regulator of gene expression⁶. Frequent alterations of initiation factors in human malignancies have highlighted the key role of translation in driving cancer behaviors, due to its position at the convergence of oncogenic signaling pathways^{7,8}. Several studies based on polysome and ribosome profiling have shown that tumor aggressiveness is driven not only by global changes in protein synthesis, but also by translation of specific subsets of mRNA. This selective translation is mainly conditioned by the ability of the eIF4F initiation complex to recruit the 40S ribosomal subunit. Consequently, the 4E-BPs have been pointed out as the main regulator of mTOR-controlled translation, through their critical impact on eIF4F formation⁹.

We have previously shown an early loss of expression of the translational repressor 4E-BP1 during mouse and human pancreatic carcinogenesis¹⁰. This event is responsible for a loss of sensitivity to mTOR inhibition, and probably reflects the acquisition of a proliferative advantage as the tumor evolves. Although this loss of expression suggests a global dysregulation of mRNA translation, we looked further for the cellular processes that were mostly affected by the absence of 4E-BP1. More particularly, we raised the possibility that pancreatic tumors might be characterized by a specific translome.

Here, we show that DNA replication is tightly controlled by the mTOR-4E-BP1 axis in pancreatic cancer cells. mTOR inhibition caused a rapid reduction of cells entering the S-phase. This effect is explained by the 4E-BP1-dependent translation repression of a restricted subset of mRNAs from genes involved in the licensing of replication origin and the maintenance of dNTP pool. Conversely, 4E-BP1 knockdown enables pancreatic cancer cells to maintain their replication despite mTOR inhibition. Our data reveal a mechanism by which cancer cells sustain their replication and may overcome chemotherapy toxicity.

Results:

1) mTOR inhibition suppresses mRNA translation of DNA replication genes in pancreatic cancer cells via 4E-BP1.

Although mTOR inhibition and subsequent 4E-BP1 activation was shown to affect the translation of mRNAs encoding Vimentin, YB1, Survivin, MMPs 9/3, MCL1, and CyclinD1^{8,11}, we did not find such regulations in pancreatic cancer cells, except for the latter (Fig. 1A). This suggests that pancreatic cancer has a distinct translome. As a consequence, we isolated total and heavy polysomal mRNA from MiaPaca-2 cells upon PP242-mediated mTOR inhibition and identified translationally regulated transcripts using DNA-microarrays (Fig.1B and supp. material). PP242 was previously shown to strongly inhibit mRNA translation and polysome formation through mTOR inhibition and 4E-BP1 dephosphorylation, with reduced impact on transcription¹². Although we found some transcriptional changes, we focused on translationally down regulated mRNAs which are most likely to be directly targeted by mTOR-4E-BP axis (supp. table 1). The ANOTA suite was used to identify genome-wide translationally regulated mRNAs (Fig. 1C). ANOTA specifically captures differences in translational activity of individual mRNAs by comparing polysome-associated mRNA levels to cytoplasmic mRNA levels¹³. Among the 682 PP242-translationally repressed transcripts, we looked for enrichment of mRNAs encoding proteins with similar functional annotations based on KEGG database (Fig. 1D). As previously reported, we found that the mTOR-4E-BP1 axis controls cell cycle progression^{12,14}. Strikingly, DNA replication and repair were the most affected processes by mTOR inhibition (about 45%). DNA replication itself accounts for about 18% of translationally repressed mRNAs. Together, these data indicate that translational control of DNA replication is a PDAC-specific signature, as previous publications have reported the process to be poorly affected by translation inhibition (2 to 8% of translationally controlled genes)^{8,12}.

We then analyzed 4E-BP1 translational control on mRNAs encoding proteins involved in DNA replication. RRM2 plays a central role in deoxynucleotides synthesis allowing the maintenance of the dNTP pool, essential for DNA polymerase processivity¹⁴. RRM2 has also been reported to impact DNA replication as well as sensitivity to chemotherapy in pancreatic cancer^{15,16}. Thus, we analyzed polysomal distribution of *RRM2* transcript following 3hours of treatment with PP242 in shScr (expressing a scrambled shRNA) and sh4E-BP1 (expressing a shRNA to 4E-BP1) MiaPaca-2 pancreatic cancer cells. shScramble MiaPaca2 cells showed a marked inhibition of polysome formation as compared to cells lacking 4E-BP1 (Fig. 1E). RT-

qPCR experiment showed that *RRM2* mRNA is mostly located in heavy polysomes fraction in both shScr and sh4E-BP1 cells, indicating an active translation of this transcript. Upon mTOR inhibition, *RRM2* mRNA shifted from heavy to light polysomes in control cells while cells lacking 4E-BP1 showed no variation of *RRM2* mRNA distribution along polysomes in the same condition (Fig. 1F). In contrast, *HPRT* mRNA distribution did not change upon PP242 in any of these cell lines. Finally, we analyzed RRM2 protein expression under the same conditions and found a strong reduction of RRM2 protein abundance when 4E-BP1 is dephosphorylated following mTOR inhibition. In sh4E-BP1 cells, RRM2 protein expression remains unchanged after the same treatment, as visualized by dephosphorylation of rpS6 protein (Fig. 1G). The abundance of CDC7 protein, a key regulator of replication origin licensing, was also found to be downregulated after mTOR inhibition, although more modestly, accordingly to moderate shift from heavy to light polysomes (Fig. 1F and G). Since these effectors related to DNA replication and origin firing are known to be synthesized in G1-phase, we emphasized our previous finding by directly looking at these proteins expression on a synchronized cell population. shScr and sh4E-BP1 cells were treated with mTOR inhibitors in early G1 phase, following mitotic shake-off synchronization as confirmed by FACS analysis (Fig. 1H top and left). We observed that G1-induced RRM2 expression was markedly reduced following PP242- and Torin1-mediated inhibition of mTOR in shScr MiaPaca-2 cells (Fig. 1H, right). Similarly, CDC6 and CDC7 protein expression was downregulated upon mTOR inhibition. In contrast, sh4E-BP1 cells showed a sustained expression of RRM2, CDC7 and CDC6 upon similar treatment, as indicated by rpS6 dephosphorylation. Altogether, downregulation of these targets corroborate our microarrays data and provides the first evidence of 4E-BP1 translational control of DNA replication and origin firing in pancreatic cancer cells.

2) Translation initiation following 4E-BP1 loss favors DNA replication and repair capacities in pancreatic cancer cells.

To functionally assess the effect of 4E-BP1 loss on pancreatic cancer cells replication, we performed quantitative image-based cytometry (QIBC). This technique allows labeling, detection, and quantification of cells actively synthesizing DNA (i.e. in S phase). QIBC was applied to shScr and sh4E-BP1 MiaPaca-2 pancreatic cancer cells treated with mTOR inhibitors, to stimulate 4E-BP1 translational repressor activity (Fig. 2A). Upon mTOR inhibition, the number of shScr cells entering S phase was drastically reduced after 3h, as attested by the reduction of EdU positivity (Fig. 2B). Conversely, sh4E-BP1 cells were far

less susceptible to PP242 treatment, with minor changes in the number of EdU-labelled cells (Fig. 2A-C). Monitoring of the cell cycle using the same QIBC data also revealed a reduced replication activity compared to sh4E-BP1 cells, evidenced by a strong reduction in EdU intensity (Fig. 2A, 2B). We confirmed that this effect is fully mediated by the translational repressor 4E-BP1, since the sole reduction in its expression abrogates the action of the two specific mTOR inhibitors PP242 and Torin1 (supp. Fig. 2).

DNA damage and initiation of DNA repair is generally indicated by the formation of γ H2AX foci in the nucleus¹⁷. Thus, we applied EdU labeling and QIBC analysis to MiaPaca2 cells following mitomycin C treatment, an inducer of DNA double-strand breaks (Fig. 2D). Data show that sh4E-BP1 Miapaca-2 cells are less susceptible to mitomycin C-induced DNA damage and recover faster from DNA damage. Together, these results suggest that increased translation following 4E-BP1 loss in pancreatic cancer cells favors DNA replication as well as DNA repair.

3) 4E-BP1 loss improves tissue regeneration upon cerulein-induced pancreatitis and oncogenic signaling upon *Sleeping Beauty*-mediated Kras expression in mouse pancreas.

Pancreatitis represents a major risk factor for pancreatic cancer development. In mouse, pancreatitis can be recapitulated by repeated i.p. injections of the powerful secretagogue cerulein. The characteristics of acute pancreatitis are edema, acinar to ductal metaplasia (or ADM) and infiltration of inflammatory cells followed by a quick regeneration of pancreatic parenchyma through an intense cell proliferation. In addition, acute pancreatitis was recently shown to induce DNA damage as visualized by activation of γ H2AX staining within ADM lesions¹⁸. Based on the exacerbated cell cycle, DNA replication and repair capacity of MiaPaca-2 cells lacking 4E-BP1, we thought that the pancreas of mice lacking 4E-BPs would have an enhanced ability to recover from acute pancreatitis. Thus, WT and 4E-BP1/2 DKO mice were subjected to acute pancreatitis followed by recovery for 2 days (Fig. 3A). H&E staining of cerulein-treated pancreas slices indicate disordered acinar structures, abundant presence of metaplastic lesions and interstitial expansion (Fig. 3B, white arrows). 4E-BP1/2 DKO mice harbor an increased ADM formation at day 3 as attested by the total metaplastic area as compared to WT mice (Fig. 3C). This is associated with an increased positivity to anti-cleaved-caspase3 and anti-CD45 IHC staining, indicative of an enhanced cerulein-induced inflammation and apoptosis (supp. Fig. 3). Surprisingly however, both genotypes show complete recovery at day 5. We then assessed proliferation rate and DNA damage by anti-ki67 and anti- γ H2AX IHC staining, respectively. Pancreata from 4E-BP null animals

show a much higher proliferation rate at day 3 and 5, together with an enhanced γ H2AX staining at day3 (Fig. 3D, 3E). These data indicate that mice lacking 4E-BPs are more susceptible to cerulein-induced pancreatitis although they completely recover from lesions, which is correlated to enhanced proliferation. One could expect that this exacerbated proliferation would lead to increased cancer susceptibility or, to a lesser extent, preneoplastic lesions development in aged DKO mice. Nevertheless, we could not detect any difference in lesions abundance in 18 month-old DKO mice as compared to their WT counterparts (data not shown).

Kras mutation is considered as the driver alteration in human PDAC and is found in about 95% of patients⁵. We then asked whether the absence of 4E-BP1 combined with Kras mutation would lead to the development of pancreatic precancerous lesions. Sleeping Beauty-based transposition strategy was applied to stably express mutated Kras in pancreas from WT or 4E-BPs DKO adult mice (Fig. 3G). Eight weeks after intrapancreatic Kras expression, we analyzed preneoplastic lesions development and Kras oncogenic signaling pathway (Fig. 3G-H). Surprisingly, none of WT and DKO mice would develop metaplastic lesions, despite of exogenous mutated Kras expression (Fig. 3G). Nevertheless, Kras-expressing DKO mice show an enhanced proliferation index (Fig. 3G ; Ki-67 IHC) together with an activation of MAPK and AKT signaling (Fig. 3H). These data indicate that lack of pancreatic 4E-BP1, combined with Kras mutation, is not sufficient to induce cancerous lesions, yet favors cell proliferation and oncogenic signaling.

Discussion

Translational control is considered as a major regulator of gene expression⁶. Although many studies and meta-analyses of microarrays and RNA-seq have provided a deep look into the mRNA nature of PDAC, none of them has addressed actively translated mRNAs. Here, we provide the 4E-BP1-dependent translome of pancreatic cancer cells. Both polysome and ribosome profiling strategies have allowed the identification of numerous translationally controlled biological processes, including cell cycle, mitochondrial activity, and cell migration. DNA replication and repair have been reported to be poorly affected by translation inhibition (from 2 to 8% of translationally controlled genes)^{8,12}. Thus, translational control of DNA replication and repair appears to be specific of pancreatic cancer cells. In low grade preneoplastic lesions in the pancreas (or PanIN), pancreatic cells show increased proliferation associated with the loss of 4E-BP1¹⁰. Upon 4E-BP1 loss, the enhanced translation of mRNAs encoding DNA replication proteins should favor a sustained proliferation. The expression of RRM2 (Ribonucleotide Reductase Regulatory Subunit M2), an essential component of the Ribonucleoside-diphosphate Reductase complex, is critical to maintain the pool of dNTP during DNA replication process. Thus, 4E-BP1-mediated downregulation of RRM2 would decrease the processivity of DNA polymerases, which could be visualized by reduced EDU incorporation (Fig. 2A, B). Slowing down DNA replication could induce DNA replication arrest and consecutive appearance of stalled replication forks, a primer event to DNA double-strand breaks. Lowering RRM2 expression has been shown to restore gemcitabine sensitivity in pancreatic cancer cells^{15,16}. Thus, one can imagine that a combination therapy based on chemotherapeutic agents (gemcitabine or 5FU) and mTOR inhibitors would overcome pancreatic cancer cells resistance. However, a recent combination therapy trial with 5-FU and everolimus has demonstrated modest benefits over monotherapy¹⁹. Our data highlight the impact of 4E-BP1 loss on the failure of mTOR inhibitors trials on PDAC²⁰ with exception of patients presenting LKB1-mutated PDAC (Peutz-Jeghers syndromes)²¹. Targeting translation inhibition emerges as an attractive strategy to reduce cancer cells proliferation and quick adaptation to chemotherapy²².

Pancreatic cancer cells display an impressive adaptability to therapeutic treatments through multiple mechanisms. Here we provide evidence that translational control in pancreatic cancer cells can impact on the resistance to chemotherapeutic treatment. PP242-mediated inhibition of translation leads to 4E-BP1-dependent inhibition of DNA replication within 6 hours by

affecting both replication and origin licensing (through *CDC7* and *CDC6*), and the pool of dNTPs (through *RRM2*), leading to enhanced chemosensitivity^{23,24}. Recently, Palam and colleagues have reported that Gemcitabine inhibits protein synthesis in PANC-1 pancreatic cancer cells through PERK-eIF2 α -ATF4 signaling. Upon phosphorylation, eIF2 α reduces translation initiation and favors synthesis of the transcription factor ATF4²⁵. The subsequent RNA-seq identified a large numbers of well-known ATF4-regulated genes as well as *Nupr1* mRNA, leading to resistance to gemcitabine-induced apoptosis. Looking at their RNA-seq data, we also found that gemcitabine favors expression of *CDC45*, a key factor for DNA replication origin licensing²⁶. Further investigations should look at gemcitabine primary effect on eIF2 α phosphorylation, and translation inhibition of subsets of mRNA. This will define whether DNA replication mechanism is also affected by PERK-eIF2 α translational control.

Pancreatitis is one major risk factor for PDAC development. Our data reveal that mice lacking 4E-BP1 show enhanced sensitivity to cerulein-induced pancreatitis and at the same time exacerbated proliferative regeneration (Fig. 3B). Previous reports have shown that the stress kinase Mnk1 is activated and that eIF4E phosphorylation is massively increased upon cerulein-induced pancreatitis. eIF4E phosphorylation is also thought to drive translation of a specific subset of mRNAs^{11,27}. In the absence of 4E-BPs, we previously showed that eIF4E is constitutively phosphorylated due to the stabilization of eIF4E/eIF4G/MNK complex²⁸. It is thus likely that enhanced eIF4E phosphorylation, consecutive to 4E-BP1 loss, contributes to the proliferative phenotype we describe.

Due to numerous inactivations in human cancer and the generation of genetic mouse models, 4E-BPs are considered as tumor suppressors²⁹. Surprisingly, mice lacking 4E-BPs did not show increased cancer susceptibility³⁰. Here, we confirm that pancreas of mice lacking 4E-BPs have no preneoplastic lesions under standard housing condition. More interestingly, inflammation (pancreatitis) or oncogene expression (mutated *Kras*) in adult mice did not induced formation of early stage lesions, despite an increased proliferative index (Ki-67 IHC, Fig. 3). Although the absence of 4E-BPs was shown to favor cancer development in a p53^{-/-} context³⁰, it seems that this event favors quick and safe tissue regeneration under the presence of functional gatekeepers, allowing for the maintenance of genomic stability. In the context of pancreatic cancer, the precocious loss of 4E-BP1 in early lesions favors uncontrolled proliferation and chemoresistance. Overall, translational control mediated by the 4E-BPs appears with two merged visages, the good and the ugly.

Material and methods

Cell culture:

MiaPaca-2 cells were obtained from the ATCC and cultured in Dulbecco's minimum essential medium (DMEM, Sigma) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS, Gibco) and 5U/ml penicillin-streptomycin (Sigma-Aldrich) at 37°C and 5% CO₂. shRNA vector accession numbers are : 4E-BP1 TRCN0000040203, Scramble SHC002 (as described in¹⁰). Cells were seeded at ~50% confluency, grown overnight, and treated using concentrations of PP242 (Sigma; stock in DMSO) indicated in the text. As a control, cells were incubated in the presence of the vehicle (DMSO). Prior to mitotic shake-off, cells were treated with nocodazole (0.1µM, 20h) and released in fresh medium for 6h. DNA double-strand breaks were induced with Mitomycin C (Sigma ; 10µg/ml, 2h) and released in fresh medium for 4h.

Polysome distribution RNA isolation, and RT-qPCR :

Cells were washed, collected, and lysed in a hypotonic lysis buffer as previously described¹⁰. Lysates were loaded onto 10-45% sucrose density gradients (20 mM HEPES-KOH (pH 7.6), 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂) and centrifuged at 45 000 rpm (SW 55 Ti rotor, Beckman Coulter, Inc.) for 45 min at 4 °C. Gradients were fractionated and the optical density (OD) at 254 nm was continuously recorded using an ISCO fractionator (Teledyne ISCO; Lincoln, NE). Polysome fractions were pooled by two (polysome-associated mRNA) and RNA was isolated using TRIzol-LS (Thermo Fisher). A parallel sample was collected from postnuclear lysates that were loaded onto the sucrose gradient (cytoplasmic mRNA) and RNA was isolated using TRIzol (Thermo Fisher). RT-qPCR reactions were carried out using RevertAid H Minus Reverse Transcriptase (Thermo Fisher) and SsoFast EvaGreen Supermix (Bio-Rad) according to the manufacturers' instructions. The list of primers is provided in suppl. Table 3.

SDS-PAGE and western blotting :

Cells were harvested on ice, washed twice with cold PBS, and lysed in 50 mM TRIS-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% NP-40 supplemented with protease and phosphatase inhibitors. Protein concentration was measured using Protein Assay reagent (Bio-Rad), and equal amounts of proteins were subjected to SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membrane (BioTraceNT ; Pall Corp). Membranes were washed in Tris Buffer Saline supplemented with 0.1% Tween 20 (TBS-T) then saturated in TBS-T with 5% non-fat dry milk, incubated overnight with primary antibodies in TBS-T with 5% BSA, washed and revealed according to Cell Signaling Technology protocol.

Immunofluorescence, microscopy and quantitative image based cytometry (QIBC):

Cells growing on 22mm coverslips were fixed in formaldehyde 3.7% (Sigma) for 10min and permeabilized in TritonX100 0.1% for 10min at room temperature. For EdU staining, cells were treated with 10 μ M EdU for 30min before fixation and then stained using the Click-it Plus EdU Alexa Fluor 647 Imaging kit (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Slides were mounted using fluorescent mounting medium (DAKO).

Images used in QIBC were obtained with an inverted wide-field microscope (Zeiss Axio Z1) equipped a fast-switching filter wheels for excitation and emission of DAPI and Cy3 fluorescent dyes and an Axiocam MRm CCD camera. NA 10x0.4 objective was used.

Acquisition times for the different channels were adjusted to obtain images in not saturating conditions and calibrated on the vehicle condition. 6 images were acquired for each condition, containing in total 4000 to 6000 cells per condition. After acquisition, images were processed for automated analysis using the CellProfiler software. DAPI signal was used for segmentation of the nuclei according to intensity threshold, generating a mask that identified each individual nucleus as an individual object. Data generated by CellProfiler were used to quantify percentage of cells in each phase of the cycle.

Cerulein-induced pancreatitis:

Wild-type (WT) and *Eif4ebp1;Eif4ebp2* double knockout (DKO) mice were previously described (Petroulakis Cancer cell 2009). Mice were subjected to two series of 6 hourly intraperitoneal injections of cerulein (Bachem AG) at a concentration of 75 μ g/kg on alternating days separated by 24 hours. Saline was injected as control. Littermate controls (WT) were injected in parallel with the experimental animals (DKO).

Mice and intrapancreatic transfection :

Mice were injected with one vector expressing the Sleeping Beauty transposase under the control of the pancreas specific promoter Elastase (pElas-SB13) and one vector expressing Human KRAS^{G12D} controlled by a strong synthetic Caggs promoter (pT2/Caggs- KRAS^{G12D}). The latter contains two inverted repeats sequences allowing SB13-mediated random genomic transposition of the Caggs-KRAS^{G12D} cassette (see suppl. material for vector construction). Plasmids were prepared using the Macherey-Nagel endotoxin-free plasmid DNA purification kit. Animals received a 2:1 molar ratio of transposon to transposase-encoding plasmid. Twenty-five micrograms of pT2/Caggs- KRAS^{G12D} was used for Groups 1 and 3 (suppl. Table 1), and this plasmid was used as the molar standard. DNA was suspended in glucose solution

at a final concentration of 5%. After median laparotomy under anesthesia, intrapancreatic transfection was performed using PEI (Polyplus-transfection) (ratio PEI nitrogen to DNA phosphate N/P = 10) in 5% glucose. A total volume of 25µl was injected in each animal.

Histology and immunostaining :

Pancreatic tissues from both control (WT) and experimental mice (DKO) were fixed overnight in 10% neutral buffered formalin, embedded in paraffin and sectioned (4µm thick). Histopathological features were determined using hematoxylin/eosin staining (H&E). Immunostaining was conducted using standard methods on formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. Antigen retrieval and antibody dilution were carried out as described in suppl. Table 4. One representative slide per mouse was imaged using a Hamamatsu Nanozoomer 2 slide scanner (Hamamatsu Photonics), ADM lesions were measured on the entire section with the Nanozoomer Digital Pathology view software (Hamamatsu).

Acknowledgment:

We thank FX Frenois from the Imag'In Plateform (IUCT) for slides scanning, the US006 for animal housing, Lucie Fontaine (Histology Plateform, U1048), Laetitia Ligat (Pôle Technologique CRCT, U1037)

Author's contribution:

D.M., R.B., designed and carried experiments. **R.S.**, performed experiments, **F.G.**, performed microarrays hybridization and QC. **L.M.S., O.L.**, analyzed microarrays data using ANOTA. **T.G.R.**, designed experiments. **D.M., Y.M.** conceived the study. **N.S.** provided 4E-BPs DKO mice. **S.P., Y.M.**, supervised the study. **T.G.R., JS.H., J.GG.** provided critical advice regarding the experimental design. **D.M., Y.M.** drafted the manuscript. **H.AL., J.GG., JS.H., N.S., O.L., C.B., S.P** edited the manuscript.

Fundings:

This work was supported by LNCC (Ligue Nationale Contre le Cancer RAB09006BBA), the the Labex TOUCAN, the Programme Hospitalo-Universitaire en Cancérologie CAPTOR.

D.M. was a recipient of a fellowship from LNCC and Fondation pour la Recherche Médicale (FRM), T.G.R. and R.B from the LNCC and R.S. from the FRM.

Figures legends

Figure 1 : mTOR inhibition suppresses translation of a subset of mRNAs in pancreatic cancer by 4E-BP1 leading replication arrest. **A)** Western blot analysis of indicated proteins in shScr or sh4EBP1 MiaPaca cells. Cells were serum starved overnight and stimulated in the presence of 2.5µM PP242 (PP242) or not with serum. **B)** Polysome profiles from MiaPaca cells treated with DMSO or PP242 (0.5µM). Absorbance at 254nm is shown as a function of sedimentation. Monosomes (80S) and heavy polysomes are indicated. **C)** Graphical plot expressing changes in cytoplasmic and polysomal mRNA levels upon PP242 treatment. Genes showing modifications in both cytoplasmic and polysomal levels (pink) or only in polysomal levels (green) are indicated. **D)** A pie chart of cellular functions of encoded proteins whose translation was suppressed by PP242. **E)** Polysome profiles of MiaPaca-2 cells expressing (shScr) or not 4E-BP1 (sh4E-BP1) incubated with vehicle or 5µM PP242 for 3h. Absorbance at 254nm is shown as a function of sedimentation. **F)** The abundance of HPRT (control), *RRM2*, and *CDC7* mRNAs in heavy, light, or subpolysomes was analyzed

by real-time PCR. Error bars indicate sd. ** $P < 0.01$. Statistical significance was determined using two-way ANOVA. **G)** Western blot analysis of indicated proteins in shScr or sh4E-BP1 MiaPaca cells treated with vehicle or PP242 (5 μ M) for 3h and 6h. **H)** Nocodazole-arrested shScr or sh4EBP1 MiaPaca cells were released for 6h, treated with either vehicle, PP242 (0.5 μ M), or Torin1 (0.1 μ M). FACS profiles indicate the G2/M synchronization in both cell lines. Cell extracts were subjected to western blot analysis. β -actin served as a loading control.

Figure 2 : Translation inhibition triggers 4E-BP1- dependent replication arrest.

A) Asynchronous shScramble or sh4E-BP1 Miapaca cells were incubated with PP242 (5 μ M) for 3hrs and labeled with EdU. Nuclear DNA was counterstained by DAPI. **B)** The proportions of replicating cells are shown as means and standard deviations and were generated from at least three independent experiments. P value was determined using two-way ANOVA. **C)** Quantitative image-based cytometry single-cell analysis (QIBC) of EdU-labeled cells. Total EdU and DAPI values from (A) are plotted in a scatter diagram. Percentages indicate the proportion of replicating cells. **D)** Quantification of γ H2AX-positive cells in S-phase. Asynchronous cells were pulsed 30min with EdU (10 μ M) prior to 2h mitomycin C treatment (10 μ g/ml) and released for 4h. Mean γ H2AX intensity was plotted for every EdU-positive cells in a scatter diagram. Errors bars indicate SD. P values were calculated using Student's t-test (** $P < 0.001$). Representative of 3 independent experiments.

Figure 3 : 4E-BP1 loss improves tissue regeneration upon cerulein-induced pancreatitis and oncogenic signaling upon Sleeping beauty-mediated Kras expression in mouse pancreas.

A) Representative hematoxylin/eosin (H&E) and **(B)** immunohistochemistry (IHC) stainings of young WT and DKO mice injected with cerulein. **C)** Quantification of ADM lesions/total pancreas surface, quantification of **(D)** Ki-67 positive cells and **(E)** γ H2AX positive cells performed on five random 10X magnification fields in each mouse. Mean \pm SEM : $P < 0.005$, Student's t-test. IHC using indicated antibody **F)** Experimental design, Sleeping Beauty transposase is expressed under the control of the pancreas specific promoter Elastase (pElas-SB13). Human KRASG12D is expressed by a strong promoter (Caggs) and flanked by inverted repeats (IR) allowing for genomic transposition. **(G)** Hematoxylin/eosin (H&E)-stained sections and immunohistochemistry (IHC) stainings of mice injected with both constructs. **(H)** Western blot analysis of pancreatic lysates from WT and DKO mice sacrificed 8 weeks after injection.

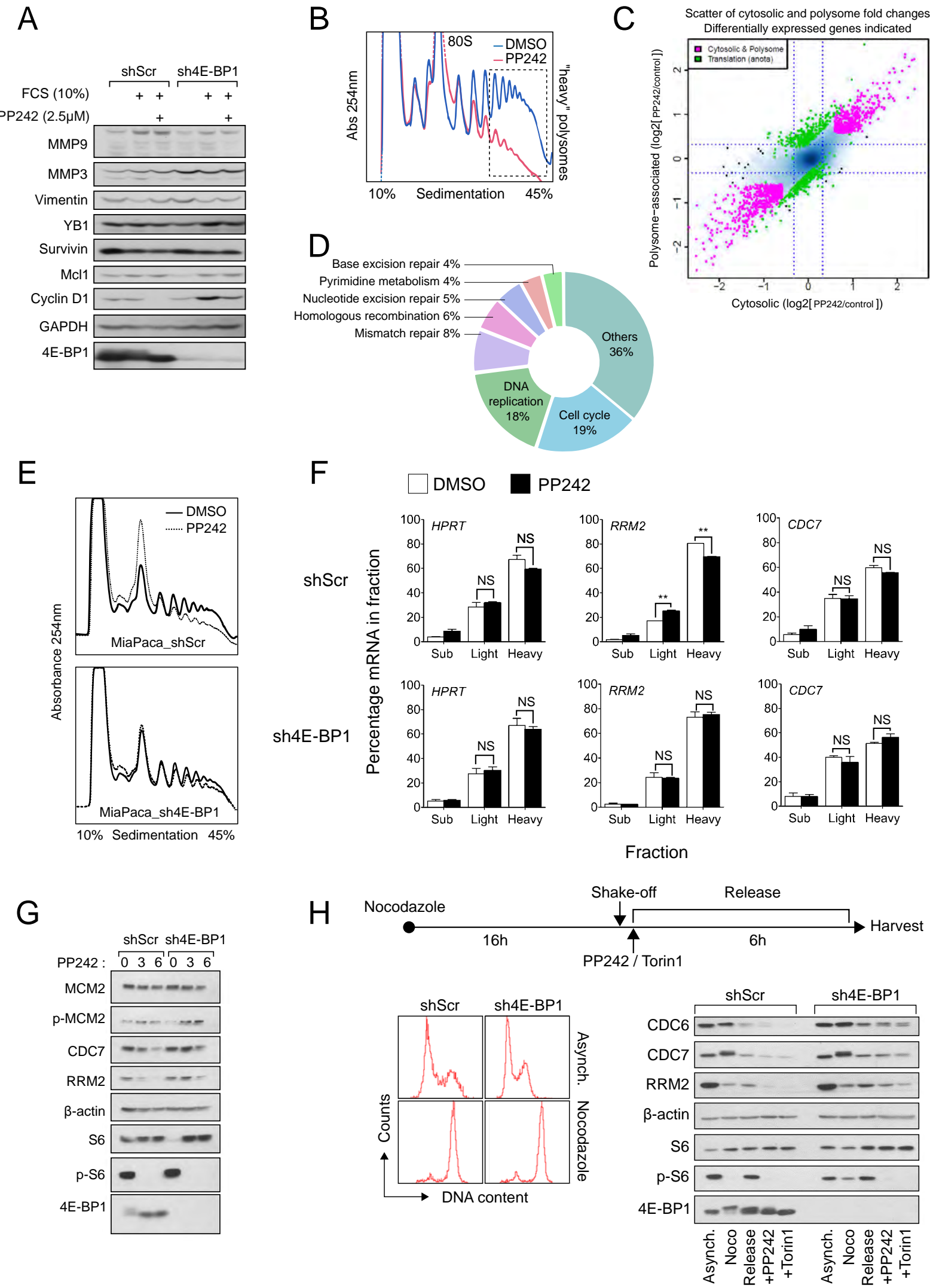
References

1. Siegel, R. L., Miller, K. D. & Jemal, A. Cancer statistics, 2016. *CA. Cancer J. Clin.* **66**, 7–30 (2016).
2. Kleeff, J. *et al.* Pancreatic cancer. *Nat. Rev. Dis. Primer* **2**, 16022 (2016).
3. Royal, R. E. *et al.* Phase 2 Trial of Single Agent Ipilimumab (Anti-CTLA-4) for Locally Advanced or Metastatic Pancreatic Adenocarcinoma: *J. Immunother.* **33**, 828–833 (2010).
4. Müller, S. *et al.* Next-generation sequencing reveals novel differentially regulated mRNAs, lncRNAs, miRNAs, sdRNAs and a piRNA in pancreatic cancer. *Mol. Cancer* **14**, (2015).
5. Bailey, P. *et al.* Genomic analyses identify molecular subtypes of pancreatic cancer. *Nature advance online publication*, (2016).
6. Schwanhäusser, B. *et al.* Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature* **473**, 337–342 (2011).
7. Hsieh, A. C. *et al.* Genetic Dissection of the Oncogenic mTOR Pathway Reveals Druggable Addiction to Translational Control via 4EBP-eIF4E. *Cancer Cell* **17**, 249–261 (2010).
8. Hsieh, A. C. *et al.* The translational landscape of mTOR signalling steers cancer initiation and metastasis. *Nature* **485**, 55–61 (2012).
9. Thoreen, C. C. *et al.* A unifying model for mTORC1-mediated regulation of mRNA translation. *Nature* **485**, 109–113 (2012).
10. Martineau, Y. *et al.* Pancreatic tumours escape from translational control through 4E-BP1 loss. *Oncogene* (2013). doi:10.1038/onc.2013.100
11. Furic, L. *et al.* eIF4E phosphorylation promotes tumorigenesis and is associated with prostate cancer progression. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 14134–14139 (2010).
12. Larsson, O. *et al.* Distinct perturbation of the translome by the antidiabetic drug metformin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, 8977–8982 (2012).

13. Larsson, O., Sonenberg, N. & Nadon, R. Identification of differential translation in genome wide studies. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 21487–21492 (2010).
14. Dowling, R. J. *et al.* mTORC1-mediated cell proliferation, but not cell growth, controlled by the 4E-BPs. *Science* **328**, 1172–6 (2010).
15. Lopez-Contreras, A. J. *et al.* Increased Rrm2 gene dosage reduces fragile site breakage and prolongs survival of ATR mutant mice. *Genes Dev.* **29**, 690–695 (2015).
16. Minami, K. *et al.* Ribonucleotide reductase is an effective target to overcome gemcitabine resistance in gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells with dual resistant factors. *J. Pharmacol. Sci.* **127**, 319–325 (2015).
17. Rogakou, E. P., Pilch, D. R., Orr, A. H., Ivanova, V. S. & Bonner, W. M. DNA Double-stranded Breaks Induce Histone H2AX Phosphorylation on Serine 139. *J. Biol. Chem.* **273**, 5858–5868 (1998).
18. Kiraly, O., Gong, G., Olipitz, W., Muthupalani, S. & Engelward, B. P. Inflammation-Induced Cell Proliferation Potentiates DNA Damage-Induced Mutations In Vivo. *PLOS Genet* **11**, e1004901 (2015).
19. Kordes, S. *et al.* Phase II study of capecitabine and the oral mTOR inhibitor everolimus in patients with advanced pancreatic cancer. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **75**, 1135–1141 (2015).
20. Wolpin, B. M. *et al.* Oral mTOR inhibitor everolimus in patients with gemcitabine-refractory metastatic pancreatic cancer. *J Clin Oncol* **27**, 193–8 (2009).
21. Klumpen, H.-J. *et al.* mTOR Inhibitor Treatment of Pancreatic Cancer in a Patient With Peutz-Jeghers Syndrome. *J. Clin. Oncol.* **29**, e150–e153 (2011).
22. Bhat, M. *et al.* Targeting the translation machinery in cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* **14**, 261–278 (2015).

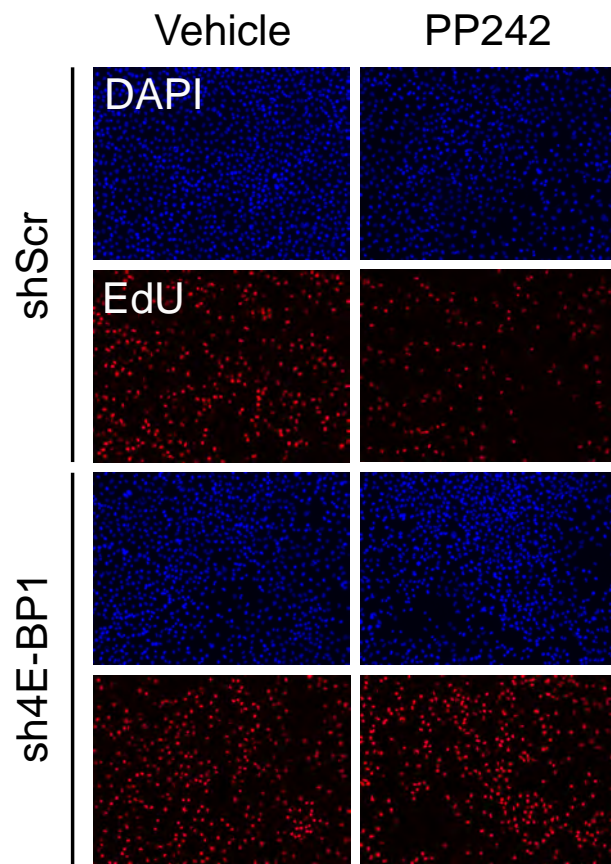
23. Huggett, M. T. *et al.* Cdc7 is a potent anti-cancer target in pancreatic cancer due to abrogation of the DNA origin activation checkpoint. *Oncotarget* **7**, 18495–18507 (2016).
24. Zhang, Y.-W., Jones, T. L., Martin, S. E., Caplen, N. J. & Pommier, Y. Implication of Checkpoint Kinase-dependent Up-regulation of Ribonucleotide Reductase R2 in DNA Damage Response. *J. Biol. Chem.* **284**, 18085–18095 (2009).
25. Vattam, K. M. & Wek, R. C. Reinitiation involving upstream ORFs regulates ATF4 mRNA translation in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 11269–11274 (2004).
26. Palam, L. R., Gore, J., Craven, K. E., Wilson, J. L. & Korc, M. Integrated stress response is critical for gemcitabine resistance in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cell Death Dis.* **6**, e1913 (2015).
27. Robichaud, N. *et al.* Phosphorylation of eIF4E promotes EMT and metastasis via translational control of SNAIL and MMP-3. *Oncogene* (2014). doi:10.1038/onc.2014.146
28. Müller, D. *et al.* 4E-BP restrains eIF4E phosphorylation. *Translation* **1**, e25819 (2013).
29. Martineau, Y., Azar, R., Bousquet, C. & Pyronnet, S. Anti-oncogenic potential of the eIF4E-binding proteins. *Oncogene* **32**, 671–677 (2013).
30. Petroulakis, E. *et al.* p53-dependent translational control of senescence and transformation via 4E-BPs. *Cancer Cell* **16**, 439–46 (2009).

Figure_1

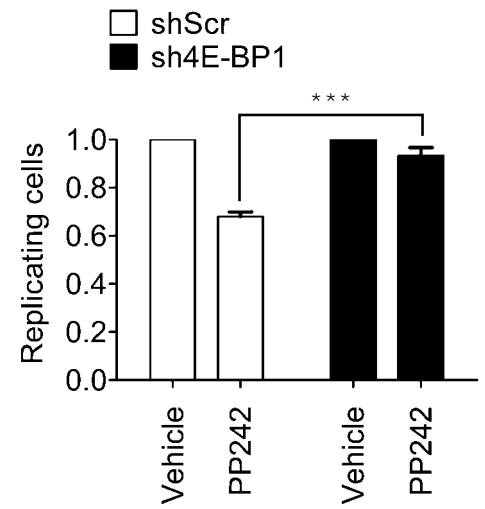


Figure_2

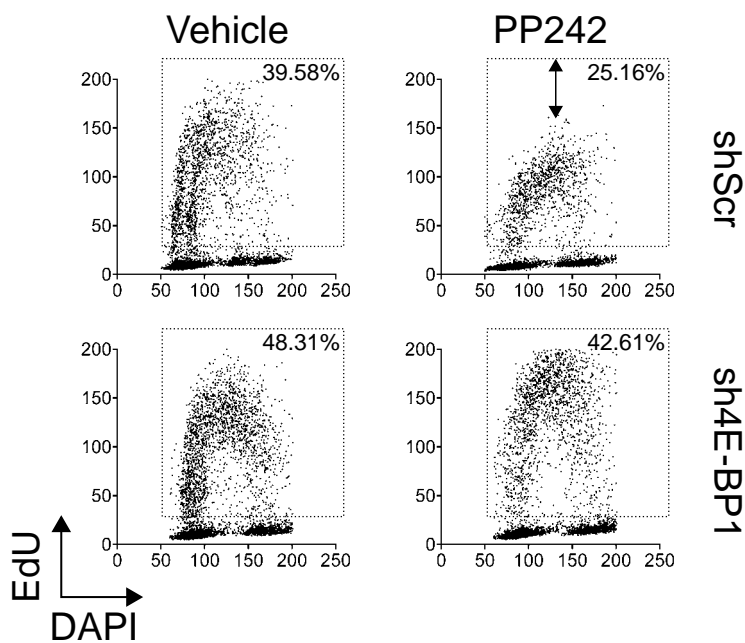
A



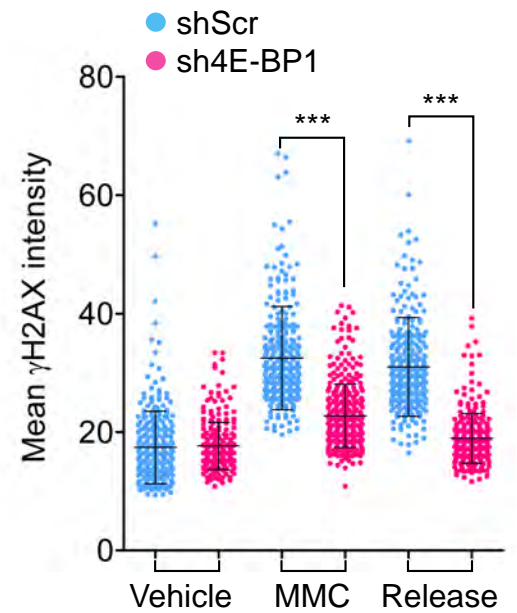
B



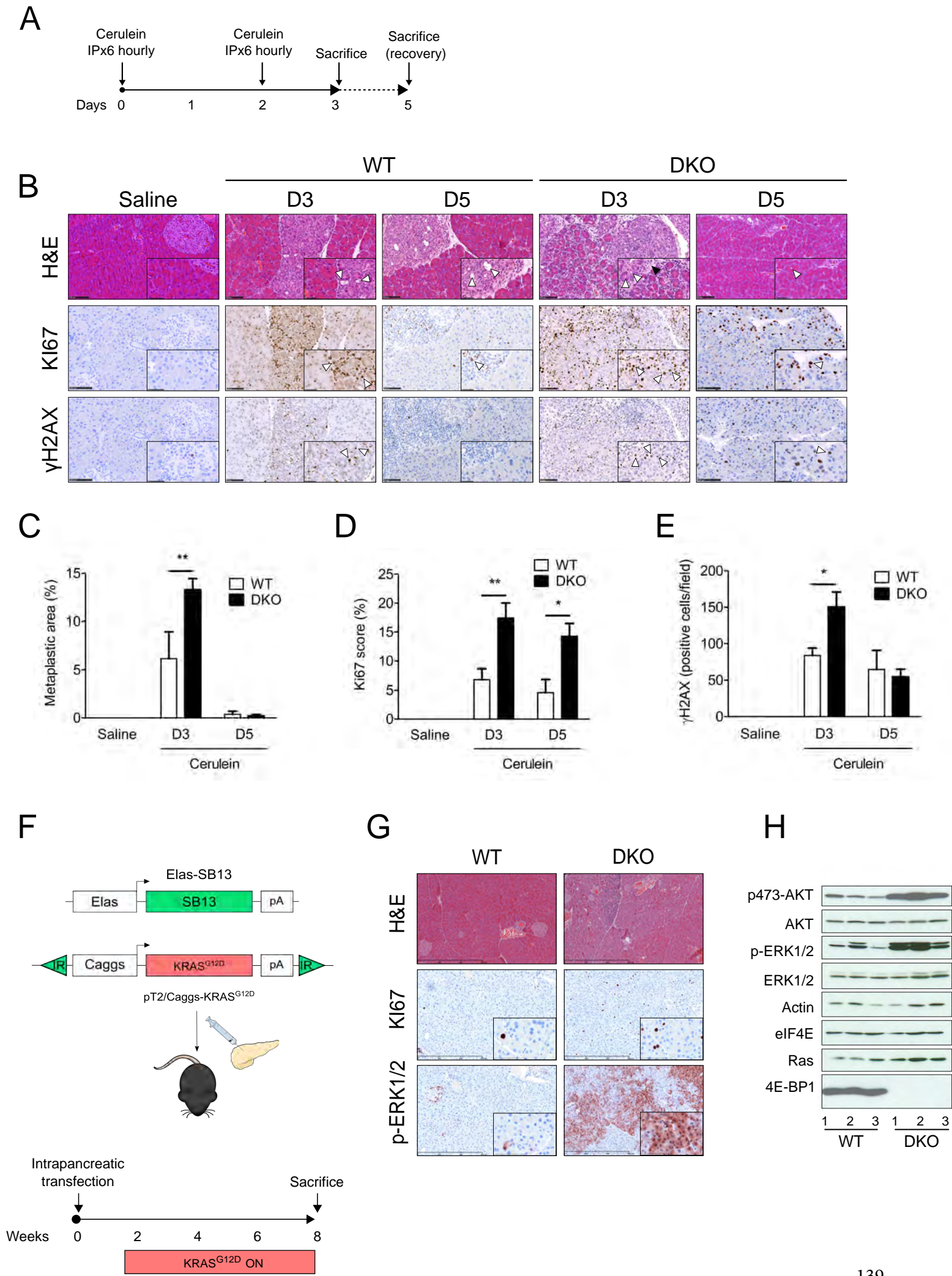
C



D



Figure_3



Supplementary material and methods:

Polysomal RNA isolation and Microarray:

Polysome profiling and RT-qPCR were carried out as described in Dowling et al.. Briefly, cells were cultured in 15 cm dishes and treated with 2.5 μ M PP242 or vehicle (DMSO) for 12 hours. Cells were washed twice with cold PBS containing 100 μ g/ml cycloheximide, collected, and lysed in a hypotonic lysis buffer (5 mM Tris-HCl (pH 7.5), 2.5 mM MgCl₂, 1.5 mM KCl, 100 μ g/ml cycloheximide, 2 mM DTT, 0.5% Triton X-100, and 0.5% sodium deoxycholate). Lysates were loaded onto 10-50% sucrose density gradients (20 mM HEPES-KOH (pH 7.6), 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂) and centrifuged at 35000 rpm (SW 40 Ti rotor, Beckman Coulter, Inc.) for 2 hours at 4 °C. Gradients were fractionated and the optical density (OD) at 254 nm was continuously recorded using an ISCO fractionator (Teledyne ISCO; Lincoln, NE).

Polysome fractions with mRNA associated with >3 ribosomes were pooled (polysome-associated mRNA) and RNA was isolated using TRIzol (Thermo Fisher). A parallel sample was collected from the postnuclear lysates that were loaded onto the sucrose gradient (cytoplasmic mRNA) and RNA was isolated using TRIzol (Thermo Fisher). For microarrays, 500 ng cytoplasmic or polysome-associated RNA ($n = 4$ from each condition) was used as starting material for the 3' IVT Express Kit (Affymetrix). The resulting labeled samples were probed with the Human Genome U133 Plus 2.0 gene arrays from Affymetrix according to the instructions of the manufacturer and scanned using the GeneArray Scanner 3000.

Vector construction :

pT2/Caggs-Luc and pPGK-SB13 were kindly provided by D.A.Largaespada of the University of Minnesota Cancer Center (Minneapolis, MN). pUC119/Elastase-hGH was provided by M. Dufresne of the Cancer Research Center of Toulouse (France). RCAS-KRAS^{G12D} was purchased from Addgene (Plasmid #11549 see MTA for reference).

pT2/Caggs-Luc was digested with EcoRI/KpnI then XbaI/KpnI to remove the Luciferase. The KRAS insert from RCAS-KRAS^{G12D} was amplified to generate a 5'EcoRI site and a 3'SpeI site for subsequent ligation in the pT2/Caggs plasmid (for primers see Table 2).

pPGK-SB13 was digested with NcoI/SmaI then NcoI/XbaI to remove the pPGK promoter. The Elastase promoter from pUC119/Elastase-hGH was amplified to generate a 5'SmaI site and a 3'XbaI site for subsequent ligation in the SB13-containing plasmid (for primers see Table 2). Resultant plasmids are pT2/Caggs-KRAS^{G12D} and pElas-SB13. SB13 transposase is a version of the SB10 transposase with two hyperactive mutations (T83A, K33A).

Table 2. RT-qPCR primers :

Species	Transcript	Primer name	Sequence (5'-3')
Human	<i>HRPT</i>	HPRTfw	TGACCTAAAGACCATTCGACTTCG
		HPRTrv	CGTGGTTCGTGGCTCTCTTATC
Human	<i>RRM2</i>	RRM2fw	ACCTATGGTGAACGTGTTGTAG
		RRM2rv	GGCATCAGTCCTCGTTTCTT
Human	<i>CDC7</i>	CDC7fw	GTGGTCTGCAGGTGTCATATT
		CDC7rv	GGGCCAAAGCAGTTAAATCATC

Table 3. Antibodies :

Target	Source	Reference	Dilution	Antigen retrieval	Applications
CD45	Rat	R&D mab114	1/300	Citrate	IHC
Cl-caspase 3	Rabbit	CST#96645	1/100	Citrate	IHC
Ki67	Rabbit	Abcam#16667	1/500	Tris-EDTA	IHC
p-ERK1/2	Rabbit	CST#4370	1/500	Citrate	IHC, WB
γ H2AX	Rabbit	CST#9718	1/500	Tris-EDTA	IHC

Table 4. Experimental groups:

Group	Genotype	Injected constructs	Mice / group
1	<i>Eif4ebp1</i> +/+	Elas-SB13 + pT2/Caggs- KRAS ^{G12D}	14
2	<i>Eif4ebp1</i> +/+	Elas-SB13	6
3	<i>Eif4ebp1</i> -/-	Elas-SB13 + pT2/Caggs- KRAS ^{G12D}	18
4	<i>Eif4ebp1</i> -/-	Elas-SB13	6

Table 5. PCR primers :

Target	Primer name	Sequence (5'-3')
RCAS- KRAS ^{G12D}	KrasEcoRI	AAAAAGAATTCATGACTGAGTATAAGCTTGTG
RCAS- KRAS ^{G12D}	KrasSpeI	TTTTTGGTACCACTAGTCTGCAGTCACATAACTG
pUC119-Elastase	ElasSmaI	AAAAACCCGGGGCTATGACCATGATT
pUC119-Elastase	ElasXbaI	GGAGTTGGGCCTTGGGATCCTCTAGAT

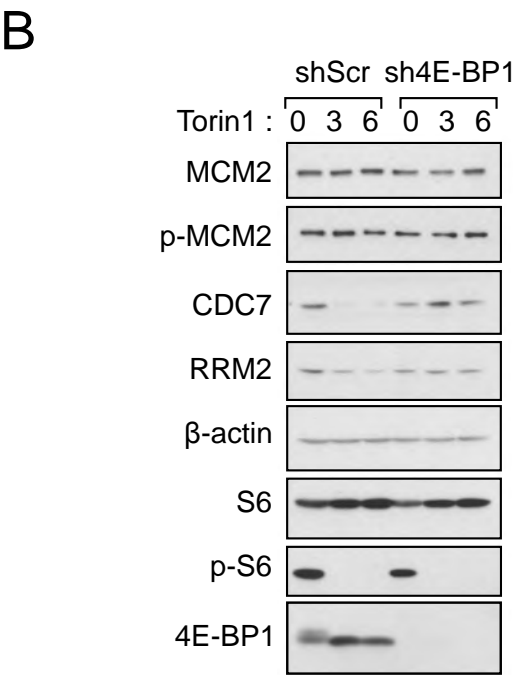
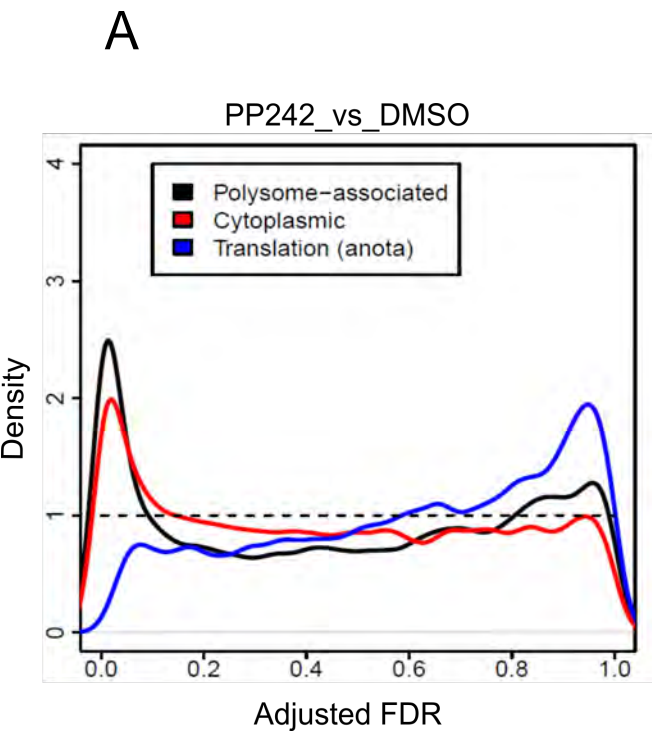
Supplementary Figures legends

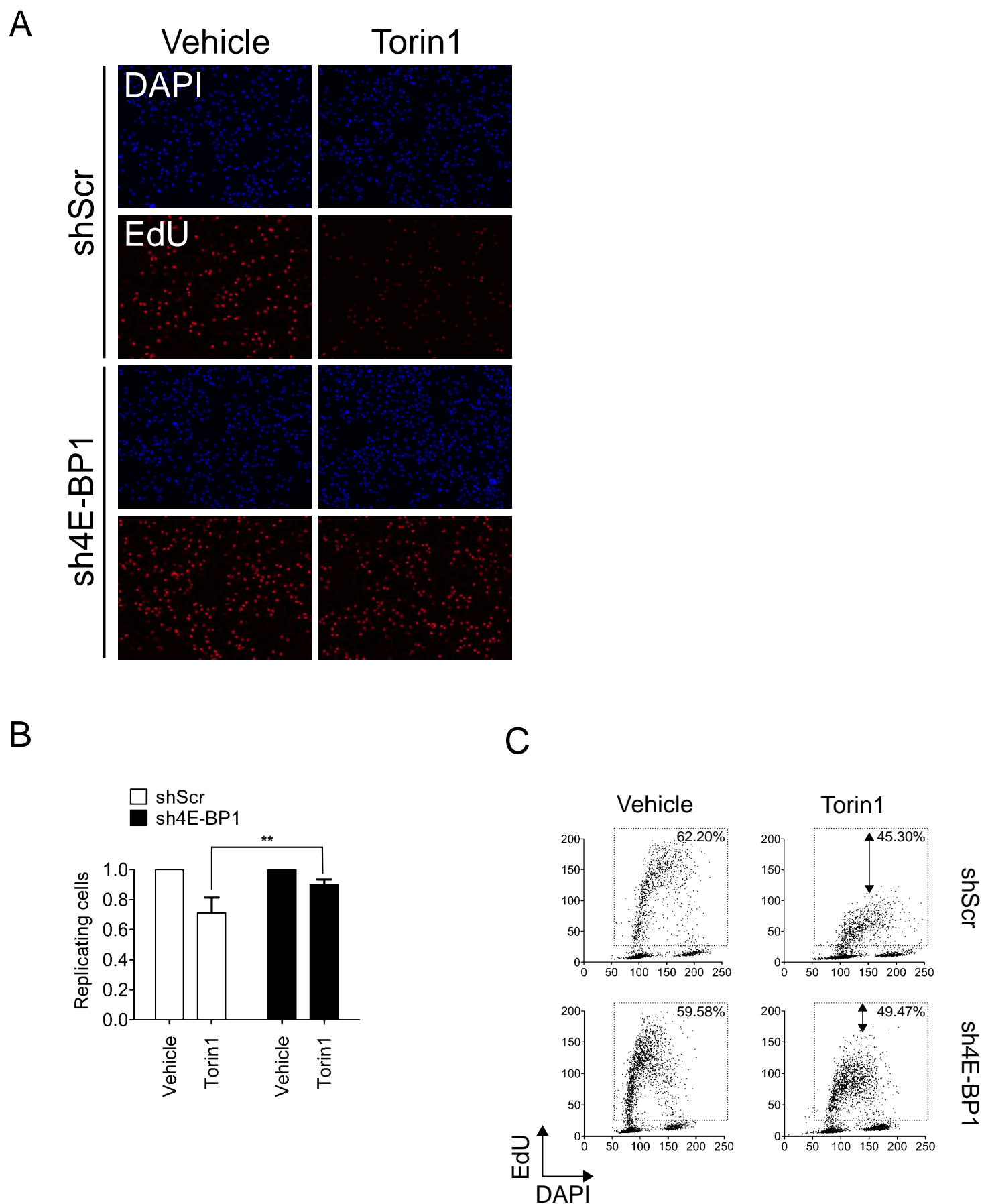
Supplementary figure 1: mTOR inhibition suppresses gene expression in pancreatic cancer cells. **A)** Kernel densities of adjusted *P* values (FDRs) for all assessed genes from ANOVA comparing all conditions using data obtained from cytoplasmic or polysome-associated mRNA and from analysis of translational activity using ANOTA. **B)** Western blot analysis of indicated proteins in shScr or sh4E-BP1 MiaPaca cells treated with vehicle or Torin1 (0.5 μ M) for 3h and 6h. β -actin served as a loading control.

Supplementary figure 2: Translation inhibition triggers 4E-BP1-dependent replication arrest. **A)** Asynchronous shScramble or sh4E-BP1 Miapaca cells were incubated with Torin1 (0.5 μ M) for 3hrs and labeled with EdU. Nuclear DNA was counterstained by DAPI. **B)** The proportions of replicating cells are shown as means and standard deviations and were generated from at least three independent experiments. *P* values were determined using two-way ANOVA. **C)** Quantitative image-based cytometry single-cell analysis (QIBC) of EdU-labeled cells. Total EdU and DAPI values from (A) are plotted in a scatter diagram. Percentages indicate the proportion of replicating cell.

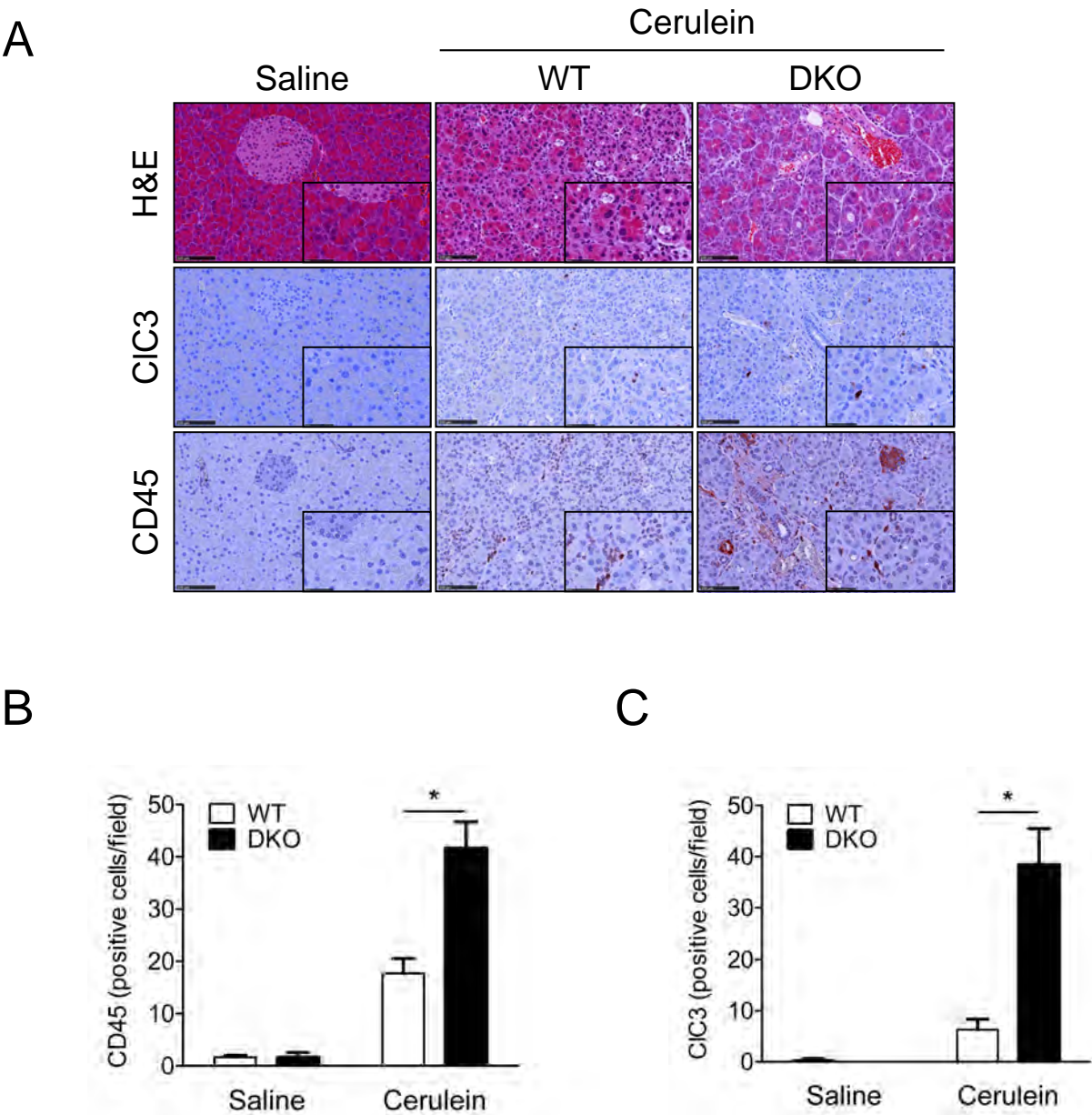
Supplementary figure 3: 4E-BP1 loss favors apoptosis and inflammatory infiltrates upon cerulein-induced pancreatitis. **A)** Representative hematoxylin/eosin (H&E) and immunohistochemistry (IHC) stainings of young WT and DKO mice injected with cerulein. Quantification of **(B)** CD-45 positive cells (CD45) and **(C)** cleaved caspase-3 positive cells (CIC3) performed on five random 10X magnification fields in each mouse. Mean \pm SEM : *P*<0.005, Student's *t*-test.

Figure_1S





Figure_3S



Discussion générale

Bien que de nombreuses altérations de la machinerie traductionnelle aient été identifiées dans les cancers, les conséquences moléculaires et fonctionnelles de ces événements n'ont que rarement été explorées. La fonction de 4E-BP1 a notamment été étudiée dans les cancers du sein et de l'ovaire, dans lesquels son inactivation par phosphorylation est corrélée au grade et constitue un facteur de mauvais pronostic (Rojo et al. 2007; Castellvi et al. 2006). Sa perte totale d'expression que nous avons mise en évidence dans l'adénocarcinome pancréatique constitue un cas sans précédent et suggère un rôle capital de la synthèse protéique dans la pathogenèse de ce cancer.

Quel mécanisme à l'origine de la perte de 4E-BP1 ?

La perte d'expression d'un tel régulateur est indéniablement liée au phénomène de dédifférenciation caractéristique de la tumorigenèse pancréatique. Le rôle de 4E-BP1 dans la physiologie pancréatique a été exploré dans le compartiment endocrine, où son expression induite par ATF4 participe à la résolution du stress du reticulum endoplasmique et la survie cellulaire (Yamaguchi et al. 2008). Son rôle dans la biologie de la cellule acineuse n'est en revanche que très peu exploré, néanmoins nos données soutiennent un mécanisme similaire à la régulation transcriptionnelle décrite pour les cellules β , mais lié à l'implication de 4E-BP1 dans la synthèse des enzymes digestives (données non publiées). D'autres travaux réalisés précédemment dans notre laboratoire avaient mis en évidence une activation transcriptionnelle de 4E-BP1 par SMAD4, en réponse au TGF- β (Azar et al. 2009). La perte de SMAD4, récurrente dans les ADK, coïncide d'ailleurs avec la perte de 4E-BP1 dans la cohorte présentée. Toutefois, la perte de SMAD4 dans l'ADK est un événement tardif, contrairement à celle de 4E-BP1, que nous observons dès le stade PanIN-1. Il semblerait donc que l'expression de 4E-BP1 soit contrôlée par plusieurs facteurs, dont l'un serait vraisemblablement altéré de manière précoce dans la carcinogenèse pancréatique.

4E-BP1 est-elle un suppresseur de tumeur ?

Dans le second article nous avons démontré que les 4E-BPs sont les principales régulatrices de la phosphorylation d'eIF4E, au travers de leur compétition avec eIF4G. Au vu du rôle de cette phosphorylation dans le potentiel oncogénique d'eIF4E, les 4E-BPs possèdent indéniablement un rôle suppresseur de tumeur (Furic et al. 2010; Wendel et al. 2007).

Les 4E-BPs ne rentrent cependant pas dans la classification binaire des oncogènes et suppresseurs de tumeurs, puisque leur délétion en homozygote n'entraîne pas la formation de tumeurs chez la souris. Toutefois, les travaux de Hsieh et collaborateurs dans le modèle murin E μ -Myc apportent les meilleures preuves quant à leur potentiel anti-oncogénique (Hsieh et al. 2010). Dans ce modèle de lymphome, l'expression d'une forme non-phosphorylable (constitutivement active) de 4E-BP1 suffit à ralentir la tumorigenèse induite par l'activation constitutive d'Akt.

Quel modèle pour appuyer son rôle anti-oncogénique in vivo ?

Les suppresseurs de tumeurs de l'ADK ont été mis en évidence par le croisement d'animaux présentant leur délétion au modèle murin d'oncogénèse classique KC. C'est ainsi que les pertes de p16, p53, SMAD4, ou plus récemment USP9X ont été décrites comme promotrices de la carcinogénèse pancréatique.

La volonté de recourir à une modélisation de type « sporadique » nous a cependant motivé à choisir l'approche Sleeping Beauty afin d'introduire une version mutée de KRAS dans le pancréas de souris DKO adultes. Des publications ayant recours à des stratégies similaires préconisent l'électroporation afin de favoriser la transfection intra-pancréatique. Le procédé tel que décrit par les travaux de Maresch et collaborateurs ne semble pas affecter significativement le tissu pancréatique, puisque les animaux contrôle ne développent aucune pathologie (Maresch et al. 2016).

Il n'est néanmoins pas certain que l'application de cette technique d'électroporation à nos vecteurs suffise à induire de manière reproductible la tumorigenèse pancréatique. Au vu des résultats présentés dans l'article 3, le déclenchement d'une pancréatite induite à la céruléine aurait pu favoriser la cancérisation initiée par Kras muté (Carrière et al. 2009). S'il n'en fut rien, il semble pourtant que la voie des MAPK soit activée de manière aberrante.

L'hypothèse la plus probable est que le niveau d'expression de Kras muté ait été insuffisant au développement de lésions néoplasiques sur cette période.

Le ciblage de mTOR : une stratégie inappropriée pour l'ADK

La conséquence directe de la perte de 4E-BP1 est la résistance des cellules cancéreuses pancréatiques aux inhibiteurs de mTOR, allostériques et catalytiques. La robustesse de ce modèle a déjà été démontrée par les travaux de Dowling et collaborateurs, néanmoins nous avons confirmé qu'il s'applique au cas de l'adénocarcinome pancréatique (Dowling et al. 2010). Ces informations sont cruciales, notamment en terme de thérapie ciblée, puisqu'une étude publiée 4 ans avant la nôtre décrivait l'inefficacité de l'everolimus dans le traitement de l'ADK dans un essai de phase III (Wolpin et al. 2009). Les travaux de Alain et collaborateurs confirment d'ailleurs la valeur pronostic de l'expression de 4E-BP1 dans la réponse aux inhibiteurs de mTOR (Alain et al. 2012).

Si nos résultats issus du premier article démontraient le bien-fondé de l'utilisation des mimétiques de 4E-BPs, ce sont les inhibiteurs de l'hélicase eIF4A qui ont été sujets à de fortes améliorations, tant au niveau de leur biodisponibilité que de leur activité. Nos données démontrent notamment une concentration efficace de ces molécules sur la survie cellulaire 1000 fois inférieure aux inhibiteurs de mTOR (**figure 23A**). Les travaux de Boussemart et collaborateurs font d'ailleurs la part belle aux dérivés de flavaglines, dont l'administration chez l'animal potentialise l'action d'un inhibiteur de BRAF et entraîne une régression tumorale considérable (Boussemart et al. 2014).

Nos résultats obtenus *in vitro* avec des dérivés du silvestrol sont encourageants puisque contrairement à l'inhibiteur de mTOR, leur effet sur la survie cellulaire est similaire sur les lignées cancéreuses pancréatiques (**figure 23A**). Par ailleurs, les premières expériences de fractionnement de polysomes révèlent un effet comparable à l'inhibition de mTOR, suggérant un mécanisme d'action tout aussi spécifique, mais bien plus efficace (**figure 23B**). Plusieurs études confirment d'ailleurs la superposition seulement partielle des cibles traductionnelles de mTOR et d'eIF4A (Rubio et al. 2014; Gandin et al. 2016).

Les inhibiteurs d'eIF4A semblent présenter de nombreux avantages, notamment leur absence de toxicité en administration chez l'animal sain. Ceci est confirmé par leur absence d'efficacité en monothérapie sur des modèles murins de cancers (Bordeleau et al. 2008; Boussemart et al. 2014). Ces paramètres sont cruciaux, au regard de la forte toxicité des chimiothérapies conventionnelles. Il s'agira désormais de démontrer que ces molécules sont capables de potentialiser l'action de la gemcitabine dans nos modèles cellulaires et animaux. Ces données permettront de confirmer que le ciblage de la traduction dans l'adénocarcinome pancréatique présente un réel intérêt thérapeutique.

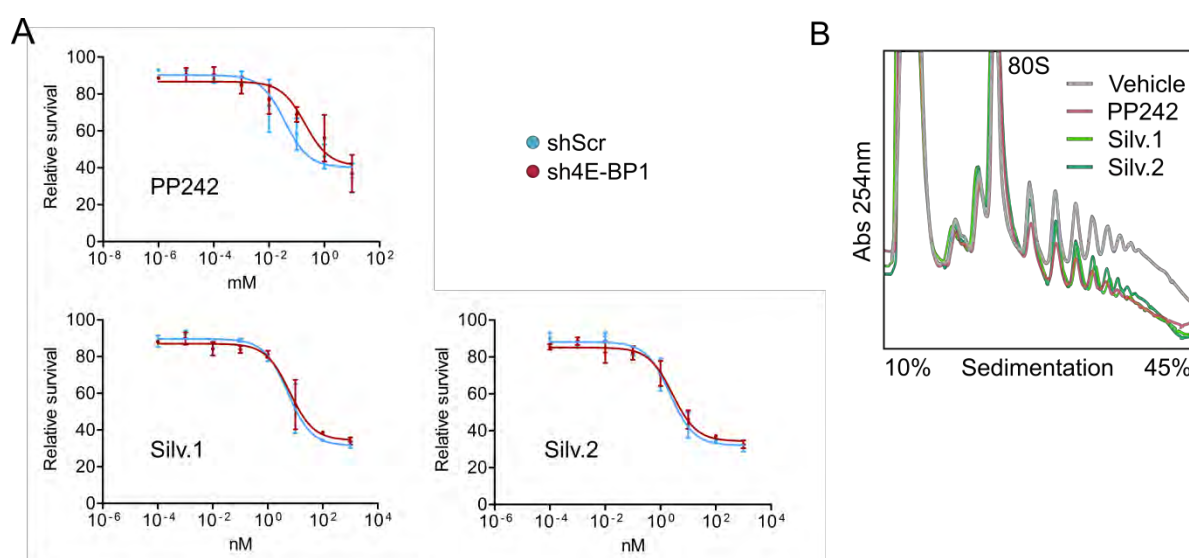


Figure 23 : Effets de dérivés du silvestrol sur les cellules cancéreuses pancréatiques

A) Tests de viabilité cellulaire en MTT. Les cellules MiaPaca shScr et sh4E-BP1 ont été traitées 24h avec les drogues aux concentrations indiquées. La survie cellulaire est relative au traitement contrôle DMSO. Les moyennes sont indiquées +/- s.e.m. **B)** Profils polysomiques de cellules MiaPaca traitées 3h avec PP242 (2.5µM), Silv.1 (100nM), Silv.2 (100nM).

Quels ARNm voient leur traduction augmentée ?

Un aspect notable de notre analyse de traductome, rarement mis en avant par les publications similaires, est l'augmentation de la traduction de certains ARNm. En effet, si les analyses de traductome s'intéressent majoritairement aux messagers dont la traduction est négativement impactée, il convient de s'interroger sur la signification d'une régulation positive. Dans notre analyse, nous identifions des effecteurs liés à la survie cellulaire, tels que BCL10 et XIAP, ainsi que d'autres liés à la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT), tels que MMP1 et SLUG. Ces messagers sont plus traduits malgré la répression traductionnelle exercée par 4E-BP1, soulignant l'effet cytostatique et non cytotoxique des inhibiteurs de mTOR, et une rapide activation de mécanismes d'adaptation.

Dans des lignées cancéreuses coliques, les travaux de Cope et collaborateurs rapportent un mécanisme de résistance aux inhibiteurs de mTOR lors de traitements longs, initié par une amplification d'*eIF4E* (Cope et al. 2014). Il est probable que l'augmentation de la traduction que nous observons pour certains messagers soit causée par un tel événement. Cette hypothèse mérite d'être étudiée, puisqu'elle confirmerait que les effecteurs impliqués dans la survie cellulaire, mais aussi dans l'EMT, sont favorisés par une disponibilité accrue d'eIF4E dans le contexte de l'ADK. De plus, elle constituerait une conséquence notable du phénomène de résistance engendrée par le déséquilibre du ratio eIF4E/4E-BP (Alain et al. 2012).

Perspectives

Notre volonté de réaliser une analyse traductomique appliquée au cancer du pancréas découlait de l'observation suivante : aucune des cibles auparavant identifiées comme eIF4E- ou mTOR-sensibles ne sont retrouvées dans l'ADK, à l'exception de la cycline D1. La mise en évidence de telles cibles constitue une information cruciale, étant donné l'activation oncogénique des voies convergeant sur mTOR dans ce cancer. L'hypothèse la plus probable était que le traductome dépend du type cellulaire, donc de l'abondance relative des ARNm. A titre d'exemple, une telle analyse appliquée aux cellules acineuses pancréatiques ferait très certainement ressortir des effecteurs liés à la sécrétion.

La cellule cancéreuse pancréatique, quant à elle, possède une caractéristique évocatrice de la pathologie : sa résistance aux traitements. Le fait que nous ayons identifié la réplication et la réparation de l'ADN comme principaux mécanismes impactés par l'inhibition de mTOR souligne la nécessité pour ces cellules de finement réguler ces processus. Une des perspectives à court terme découlant de ces observations est l'établissement d'un lien entre synthèse protéique altérée et résistance à la chimiothérapie, chez le patient, grâce aux marqueurs que nous avons identifiés dans notre dernière étude.

Durant l'écriture de cette thèse, des travaux publiés par le groupe du Dr. David Tuveson ont permis de renforcer le rôle de la synthèse protéique dans l'oncogenèse pancréatique. Ceux-ci démontrent que le facteur de transcription NRF2, responsable de l'élimination des espèces réactives de l'oxygène, empêche aussi l'oxydation de nombreux facteurs de la traduction. Ainsi la perte d'expression de NRF2, dans divers modèles, entraîne une diminution de la traduction et une réduction du volume tumoral chez l'animal. Ces travaux apportent la première véritable démonstration que l'évolution du cancer pancréatique nécessite une traduction soutenue (Chio et al. 2016).

Bien qu'elles soutiennent nos hypothèses de travail, ces données révèlent que d'autres voies régulent la traduction durant l'oncogenèse pancréatique, en parallèle de l'axe mTOR/eIF4E/4E-BP. Une observation récurrente issue de nos expériences mais aussi de la littérature est que l'inhibition de l'axe mTOR/eIF4E/4E-BP est insuffisante à bloquer la traduction de tous les ARNm. Il est donc évident que d'autres mécanismes, en condition basale et de stress, soient mis en place pour permettre à ces ARNm de maintenir leur traduction.

Très récemment, les travaux de Lee et collaborateurs ont mis en évidence la capacité du complexe eIF3 à lier la coiffe des ARNm, par l'intermédiaire de la sous-unité eIF3d (Lee et al. 2016). Ainsi eIF4E, consacrée comme « protéine de liaison à la coiffe », ne serait pas le seul facteur capable d'initier la synthèse protéique de manière cap-dépendante. La capacité intrinsèque du complexe eIF3 à recruter le ribosome suggère qu'une initiation par son biais pourrait être plus efficace et rapide, ce qui reste à étudier. Dans cette publication, les auteurs révèlent que l'ARNm de l'oncogène *c-Jun* est capable d'initier sa traduction via l'eIF3 en réprimant le recrutement d'eIF4E par un élément situé en 5'UTR.

L'étude de mécanismes alternatifs d'initiation de la traduction présenterait un intérêt tout particulier dans le contexte de l'ADK, où le rôle de la synthèse protéique est désormais avéré, et où l'axe mTOR/eIF4E/4EBP1 n'est vraisemblablement pas le seul engagé. La surexpression de diverses sous-unités du complexe eIF3 est rapportée pour de nombreux cancers, mais sans conséquences moléculaires avérées (Bhat et al. 2015). Il apparaît ainsi pertinent d'étudier le statut de l'eIF3, et en particulier de la sous-unité eIF3d, dans les tumeurs pancréatiques. Les travaux de Lee et collaborateurs rapportent que son activité de traduction n'est pas perturbée par l'inhibition de mTOR. Le fait que la traduction initiée par eIF3 permette l'expression de certains oncogènes dans ces conditions souligne l'importance à accorder à cette synthèse protéique « marginale ».

Dans une considération plus générale, mes travaux de thèse démontrent que l'analyse du traductome fournit des informations fonctionnelles sur la biologie de la cellule cancéreuse. Bien que réalisée sur une seule lignée cellulaire, notre stratégie a prouvé que les données obtenues en puces d'expression sont directement vérifiables sur le comportement des cellules, *in vitro*. Déjà réalisée dans d'autres types de cancers, cette approche prouve une fois de plus sa pertinence en cancérologie, en particulier dans la mise en évidence des processus liés à la résistance thérapeutique (Hsieh et al. 2012; Boussemart et al. 2014).

Jusqu'à présent, les diverses approches à grande échelle, qu'elles soient génomiques ou transcriptomiques, ont permis d'établir des sous-types moléculaires, dont la précision est appuyée par le nombre important d'échantillons (P. Bailey et al. 2016). Toutefois, ces analyses ne sont pas parvenues à identifier de « faille » profitable à une stratégie thérapeutique. Au vu de l'importance de l'efficacité traductionnelle dans l'expression génique, il paraît pertinent d'envisager l'analyse traductomique comme nouvel outil « standardisé » de recherche.

Si elle présente quelques exigences techniques (quantité de matériel biologique, fractionnement des polysomes), l'étude du traductome, à un niveau expérimental, permettrait d'évaluer la pertinence des transcriptomes déjà réalisés. Dans cette perspective, l'adénocarcinome pancréatique se présente comme le meilleur candidat à ce type d'approche puisque ni son grand nombre de mutations déjà identifiées, ni ses « voies moléculaires » activées ne traduisent directement ses caractéristiques fonctionnelles.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aguirre, Andrew J., Nabeel Bardeesy, Manisha Sinha, Lyle Lopez, David A. Tuveson, James Horner, Mark S. Redston, and Ronald A. DePinho. 2003. —Activated Kras and Ink4a/Arf Deficiency Cooperate to Produce Metastatic Pancreatic Ductal Adenocarcinoma.” *Genes & Development* 17 (24): 3112–26. doi:10.1101/gad.1158703.
- Alain, Tommy, Masahiro Morita, Bruno D. Fonseca, Akiko Yanagiya, Nadeem Siddiqui, Mamatha Bhat, Domenick Zammit, et al. 2012. —4E/4E-BP Ratio Predicts the Efficacy of mTOR Targeted Therapies.” *Cancer Research* 72 (24): 6468–76. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-2395.
- Alizadeh, Ash A., Michael B. Eisen, R. Eric Davis, Chi Ma, Izidore S. Lossos, Andreas Rosenwald, Jennifer C. Boldrick, et al. 2000. —Distinct Types of Diffuse Large B-Cell Lymphoma Identified by Gene Expression Profiling.” *Nature* 403 (6769): 503–11. doi:10.1038/35000501.
- Almoguera, C., D. Shibata, K. Forrester, J. Martin, N. Arnheim, and M. Perucho. 1988. —Most Human Carcinomas of the Exocrine Pancreas Contain Mutant c-K-Ras Genes.” *Cell* 53 (May): 549–54.
- Altman, Jessica K., Amy Szilard, Bruce W. Konicek, Philip W. Iversen, Barbara Kroczyńska, Heather Glaser, Antonella Sassano, Eliza Vakana, Jeremy R. Graff, and Leonidas C. Platanias. 2013. —Inhibition of Mnk Kinase Activity by Cercosporamide and Suppressive Effects on Acute Myeloid Leukemia Precursors.” *Blood* 121 (18): 3675–81. doi:10.1182/blood-2013-01-477216.
- Apelqvist, Åsa, Ulf Ahlgren, and Helena Edlund. 1997. —Sonic Hedgehog Directs Specialised Mesoderm Differentiation in the Intestine and Pancreas.” *Current Biology* 7 (10): 801–4. doi:10.1016/S0960-9822(06)00340-X.
- Armengol, Gemma, Federico Rojo, Josep Castellví, Carmela Iglesias, Miriam Cuatrecasas, Berta Pons, José Baselga, and Santiago Ramón y Cajal. 2007. —4EBinding Protein 1: A Key Molecular ‘Funnel Factor’ in Human Cancer with Clinical Implications.” *Cancer Research* 67 (16): 7551–55. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-0881.
- Asperen, C. J. van, R. M. Brohet, E. J. Meijers-Heijboer, N. Hoogerbrugge, S. Verhoef, H. F. A. Vasen, M. G. E. M. Ausems, et al. 2005. —Cancer Risks in BRCA2 Families: Estimates for Sites Other than Breast and Ovary.” *Journal of Medical Genetics* 42 (9): 711–19. doi:10.1136/jmg.2004.028829.
- Assouline, Sarit, Biljana Culjkovic, Eftihia Cocolakis, Caroline Rousseau, Nathalie Beslu, Abdellatif Amri, Stephen Caplan, et al. 2009. —Molecular Targeting of the Oncogene eIF4E in Acute Myeloid Leukemia (AML): A Proof-of-Principle Clinical Trial with Ribavirin.” *Blood* 114 (2): 257–60. doi:10.1182/blood-2009-02-205153.
- Avdulov, Svetlana, Shunan Li, Van Michalek, David Burrichter, Mark Peterson, David M Perlman, J Carlos Manivel, et al. 2004. —Activation of Translation Complex eIF4F Is Essential for the Genesis and Maintenance of the Malignant Phenotype in Human Mammary Epithelial Cells.” *Cancer Cell* 5 (6): 553–63. doi:10.1016/j.ccr.2004.05.024.
- Azar, Rania, Amandine Alard, Christiane Susini, Corinne Bousquet, and Stéphane Pyronnet. 2009. —4EBP1 Is a Target of Smad4 Essential for TGFβ-Mediated Inhibition of Cell Proliferation.” *The EMBO Journal* 28 (22): 3514–22. doi:10.1038/emboj.2009.291.
- Baer, Romain, Célia Cintas, Marlène Dufresne, Stéphanie Cassant-Sourdy, Nina Schönhuber, Laetitia Planque, Hubert Lulka, et al. 2014. —Pancreatic Cell Plasticity and Cancer Initiation Induced by Oncogenic Kras Is Completely Dependent on Wild-Type PI 3-Kinase p110α.” *Genes & Development* 28 (23): 2621–35. doi:10.1101/gad.249409.114.
- Bailey, J. M., A. M. Hendley, K. J. Lafaro, M. A. Pruski, N. C. Jones, J. Alsina, M. Younes, et al. 2015. —p53 Mutations Cooperate with Oncogenic Kras to Promote Adenocarcinoma from Pancreatic Ductal Cells.” *Oncogene*, November. doi:10.1038/onc.2015.441.
- Bailey, Jennifer M., Janivette Alsina, Zeshaan A. Rasheed, Florencia M. McAllister, Ya-Yuan Fu, Ruben Plentz, Hao Zhang, et al. 2014. —DCK1 Marks a Morphologically Distinct Subpopulation of Cells With Stem Cell Properties in Preinvasive Pancreatic Cancer.” *Gastroenterology* 146 (1): 245–56. doi:10.1053/j.gastro.2013.09.050.
- Bailey, Peter, David K. Chang, Katia Nones, Amber L. Johns, Ann-Marie Patch, Marie-Claude Gingras, David K. Miller, et al. 2016. —Genomic Analyses Identify Molecular Subtypes of Pancreatic Cancer.” *Nature* advance online publication. doi:10.1038/nature16965.

- Bardeesy, Nabeel, Kuang-hung Cheng, Justin H. Berger, Gerald C. Chu, Jessica Pahler, Peter Olson, Aram F. Hezel, et al. 2006. —*Smad4* Is Dispensable for Normal Pancreas Development yet Critical in Progression and Tumor Biology of Pancreas Cancer.” *Genes & Development* 20 (22): 3130–46. doi:10.1101/gad.1478706.
- Bell, Jonathan B., Frank Eckerdt, Kristen Alley, Lisa P. Magnusson, Hridi Hussain, Yingtao Bi, Ahmet Dirim Arslan, et al. 2016. —*INK* Inhibition Disrupts Mesenchymal Glioma Stem Cells and Prolongs Survival in a Mouse Model of Glioblastoma.” *American Association for Cancer Research*, January, molcanres.0172.2016. doi:10.1158/1541-7786.MCR-16-0172.
- Benod, Cindy, Maia V. Vinogradova, Natalia Jouravel, Grace E. Kim, Robert J. Fletterick, and Elena P. Sablin. 2011. —*Nuclear Receptor Liver Receptor Homologue 1 (LRH-1)* Regulates Pancreatic Cancer Cell Growth and Proliferation.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (41): 16927–31. doi:10.1073/pnas.1112047108.
- Ben-Sahra, Issam, Jessica J. Howell, John M. Asara, and Brendan D. Manning. 2013. —*Stimulation of de Novo Pyrimidine Synthesis by Growth Signaling Through mTOR and S6K1.*” *Science* 339 (6125): 1323–28. doi:10.1126/science.1228792.
- Bhat, Mamatha, Nathaniel Robichaud, Laura Hulea, Nahum Sonenberg, Jerry Pelletier, and Ivan Topisirovic. 2015. —*Targeting the Translation Machinery in Cancer.*” *Nature Reviews Drug Discovery* 14 (4): 261–78. doi:10.1038/nrd4505.
- Biankin, Andrew V, Nicola Waddell, Karin S Kassahn, Marie-Claude Gingras, Lakshmi B Muthuswamy, Amber L Johns, David K Miller, et al. 2012. —*Pancreatic Cancer Genomes Reveal Aberrations in Axon Guidance Pathway Genes.*” *Nature* 491 (7424): 399–405. doi:10.1038/nature11547.
- Bordeleau, Marie-Eve, Regina Cencic, Lisa Lindqvist, Monika Oberer, Peter Northcote, Gerhard Wagner, and Jerry Pelletier. 2006. —*RM-Mediated Sequestration of the RNA Helicase eIF4A by Pateamine A Inhibits Translation Initiation.*” *Chemistry & Biology* 13 (12): 1287–95. doi:10.1016/j.chembiol.2006.10.005.
- Bordeleau, Marie-Eve, Francis Robert, Baudouin Gerard, Lisa Lindqvist, Samuel M.H. Chen, Hans-Guido Wendel, Brigitte Brem, et al. 2008. —*Therapeutic Suppression of Translation Initiation Modulates Chemosensitivity in a Mouse Lymphoma Model.*” *Journal of Clinical Investigation*, June. doi:10.1172/JCI34753.
- Both, Gerald W., Yasuhiro Furuichi, S. Muthukrishnan, and A. J. Shatkin. 1975. —*Ribosome Binding to Reovirus mRNA in Protein Synthesis Requires 5' Terminal 7-Methylguanosine.*” *Cell* 6 (2): 185–95. doi:10.1016/0092-8674(75)90009-4.
- Boussemart, Lise, Hélène Malka-Mahieu, Isabelle Girault, Delphine Allard, Oskar Hemmingsson, Gorana Tomasic, Marina Thomas, et al. 2014. —*EF4F Is a Nexus of Resistance to Anti-BRAF and Anti-MEK Cancer Therapies.*” *Nature*. doi:10.1038/nature13572.
- Brunn, G J, C C Hudson, A Sekulić, J M Williams, H Hosoi, P J Houghton, J C Lawrence Jr, and R T Abraham. 1997. —*Phosphorylation of the Translational Repressor PHAS-I by the Mammalian Target of Rapamycin.*” *Science (New York, N.Y.)* 277 (5322): 99–101.
- Burnett, Patrick E., Roxanne K. Barrow, Noam A. Cohen, Solomon H. Snyder, and David M. Sabatini. 1998. —*RAIT1 Phosphorylation of the Translational Regulators p70 S6 Kinase and 4E-BP1.*” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95 (4): 1432–37.
- Busnardo, Antonio C., Liberato J. A. DiDio, Robert T. Tidrick, and Neil R. Thomford. 1983. —*History of the Pancreas.*” *The American Journal of Surgery* 146 (5): 539–50. doi:10.1016/0002-9610(83)90286-6.
- Campbell, Peter J., Shinichi Yachida, Laura J. Mudie, Philip J. Stephens, Erin D. Pleasance, Lucy A. Stebbings, Laura A. Morsberger, et al. 2010. —*The Patterns and Dynamics of Genomic Instability in Metastatic Pancreatic Cancer.*” *Nature* 467 (7319): 1109–13. doi:10.1038/nature09460.
- Carracedo, Arkaitz, Li Ma, Julie Teruya-Feldstein, Federico Rojo, Leonardo Salmena, Andrea Alimonti, Ainara Egia, et al. 2008. —*Inhibition of mTORC1 Leads to MAPK Pathway Activation through a PI3K-Dependent Feedback Loop in Human Cancer.*” *Journal of Clinical Investigation*, August. doi:10.1172/JCI34739.
- Carriere, Audrey, Yves Romeo, Hugo A. Acosta-Jaquez, Julie Moreau, Eric Bonneil, Pierre Thibault, Diane C. Fingar, and Philippe P. Roux. 2011. —*EK1/2 Phosphorylate Raptor to Promote Ras-*

- Dependent Activation of mTOR Complex 1 (mTORC1).” *Journal of Biological Chemistry* 286 (1): 567–77. doi:10.1074/jbc.M110.159046.
- Carrière, Catherine, Alison L Young, Jason R Gunn, Daniel S Longnecker, and Murray Korc. 2009. —Acute Pancreatitis Markedly Accelerates Pancreatic Cancer Progression in Mice Expressing Oncogenic Kras.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 382 (3): 561–65. doi:10.1016/j.bbrc.2009.03.068.
- Castellvi, J., A. Garcia, F. Rojo, C. Ruiz-Marcellan, A. Gil, J. Baselga, and S. Ramon y Cajal. 2006. —Phosphorylated 4E Binding Protein 1: A Hallmark of Cell Signaling That Correlates with Survival in Ovarian Cancer.” *Cancer* 107 (October): 1801–11. doi:10.1002/cncr.22195.
- Cencic, R., M. Desforges, D. R. Hall, D. Kozakov, Y. Du, J. Min, R. Dingledine, et al. 2011. —Blocking eIF4E-eIF4G Interaction as a Strategy To Impair Coronavirus Replication.” *J Virol* 85 (July): 6381–89. doi:10.1128/JVI.00078-11.
- Cencic, Regina, Marilyn Carrier, Gabriela Galicia-Vázquez, Marie-Eve Bordeleau, Rami Sukarieh, Annie Bourdeau, Brigitte Brem, et al. 2009. —Antitumor Activity and Mechanism of Action of the Cyclopenta[B]Benzofuran, Silvestrol.” *PLOS ONE* 4 (4): e5223. doi:10.1371/journal.pone.0005223.
- Cencic, Regina, David R. Hall, Francis Robert, Yuhong Du, Jaeki Min, Lian Li, Min Qui, et al. 2011. —Reversing Chemoresistance by Small Molecule Inhibition of the Translation Initiation Complex eIF4F.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108 (3): 1046–51. doi:10.1073/pnas.1011477108.
- Chantrill, Lorraine A., Adnan M. Nagrial, Clare Watson, Amber L. Johns, Mona Martyn-Smith, Skye Simpson, Scott Mead, et al. 2015. —Precision Medicine for Advanced Pancreas Cancer: The Individualized Molecular Pancreatic Cancer Therapy (IMPaCT) Trial.” *Clinical Cancer Research* 21 (9): 2029–37. doi:10.1158/1078-0432.CCR-15-0426.
- Childs, Erica J., Evelina Mocci, Daniele Campa, Paige M. Bracci, Steven Gallinger, Michael Goggins, Donghui Li, et al. 2015. —Common Variation at 2p13.3, 3q29, 7p13 and 17q25.1 Associated with Susceptibility to Pancreatic Cancer.” *Nature Genetics* 47 (8): 911–16. doi:10.1038/ng.3341.
- Chio, Iok In Christine, Seyed Mehdi Jafarnejad, Mariano Ponz-Sarvisé, Youngkyu Park, Keith Rivera, Wilhelm Palm, John Wilson, et al. 2016. —NR2 Promotes Tumor Maintenance by Modulating mRNA Translation in Pancreatic Cancer.” *Cell* 166 (4): 963–76. doi:10.1016/j.cell.2016.06.056.
- Choi, Kin Man, Lloyd P. McMahon, and John C. Lawrence. 2003. —Two Motifs in the Translational Repressor PHAS-I Required for Efficient Phosphorylation by Mammalian Target of Rapamycin and for Recognition by Raptor.” *Journal of Biological Chemistry* 278 (22): 19667–73. doi:10.1074/jbc.M301142200.
- Choo, Andrew Y., Sang-Oh Yoon, Sang Gyun Kim, Philippe P. Roux, and John Blenis. 2008. —Rapamycin Differentially Inhibits S6Ks and 4E-BP1 to Mediate Cell-Type-Specific Repression of mRNA Translation.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 (45): 17414–19. doi:10.1073/pnas.0809136105.
- Chresta, Christine M., Barry R. Davies, Ian Hickson, Tom Harding, Sabina Cosulich, Susan E. Critchlow, John P. Vincent, et al. 2010. —AZD8055 Is a Potent, Selective, and Orally Bioavailable ATP-Competitive Mammalian Target of Rapamycin Kinase Inhibitor with In Vitro and In Vivo Antitumor Activity.” *Cancer Research* 70 (1): 288–98. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-1751.
- Chu, Jennifer, Gabriela Galicia-Vázquez, Regina Cencic, John R. Mills, Alexandra Katigbak, John A. Porco Jr., and Jerry Pelletier. 2016. —CRISPR-Mediated Drug-Target Validation Reveals Selective Pharmacological Inhibition of the RNA Helicase, eIF4A.” *Cell Reports*. Accessed June 10. doi:10.1016/j.celrep.2016.05.005.
- Cohn, Jonathan A., John P. Neoptolemos, Jinong Feng, Jin Yan, Zefei Jiang, William Greenhalf, Christopher McFaul, Roger Mountford, and Steve S. Sommer. 2005. —Increased Risk of Idiopathic Chronic Pancreatitis in Cystic Fibrosis Carriers.” *Human Mutation* 26 (4): 303–7. doi:10.1002/humu.20232.
- Collins, Meredith A., Filip Bednar, Yaqing Zhang, Jean-Christophe Brisset, Stefanie Galbán, Craig J. Galbán, Sabita Rakshit, Karen S. Flannagan, N. Volkan Adsay, and Marina Pasca di

- Magliano. 2012. —Oncogenic Kras Is Required for Both the Initiation and Maintenance of Pancreatic Cancer in Mice.” *Journal of Clinical Investigation* 122 (2): 639–53. doi:10.1172/JCI59227.
- Collisson, Eric A., Anguraj Sadanandam, Peter Olson, William J. Gibb, Morgan Truitt, Shenda Gu, Janine Cooc, et al. 2011. —Subtypes of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma and Their Differing Responses to Therapy.” *Nature Medicine* 17 (4): 500–503. doi:10.1038/nm.2344.
- Collisson, Eric A., Christy L. Trejo, Jillian M. Silva, Shenda Gu, James E. Korkola, Laura M. Heiser, Roch-Philippe Charles, et al. 2012. —A Central Role for RAF→MEK→ERK Signaling in the Genesis of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma.” *Cancer Discovery* 2 (8): 685–93. doi:10.1158/2159-8290.CD-11-0347.
- Colman, Hélène, Catherine Le Berre-Scoul, Céline Hernandez, Sandra Pierredon, Audrey Bihouée, Rémi Houlgatte, Stephan Vagner, Arielle R. Rosenberg, and Cyrille Féray. 2013. —Genome-Wide Analysis of Host mRNA Translation during Hepatitis C Virus Infection.” *Journal of Virology* 87 (12): 6668–77. doi:10.1128/JVI.00538-13.
- Conroy, T., F. Desseigne, M. Ychou, O. Bouche, R. Guimbaud, Y. Becouarn, A. Adenis, et al. 2011. —FOLFIRINOX versus Gemcitabine for Metastatic Pancreatic Cancer.” *N Engl J Med* 364 (May): 1817–25. doi:10.1056/NEJMoa1011923.
- Cook, David, Darg Brown, Robert Alexander, Ruth March, Paul Morgan, Gemma Satterthwaite, and Menelas N. Pangalos. 2014. —Lessons Learned from the Fate of AstraZeneca’s Drug Pipeline: A Five-Dimensional Framework.” *Nature Reviews Drug Discovery* 13 (6): 419–31. doi:10.1038/nrd4309.
- Cope, Claire L., Rebecca Gilley, Kathryn Balmanno, Matthew J. Sale, Karen D. Howarth, Mark Hampson, Paul D. Smith, Sylvie M. Guichard, and Simon J. Cook. 2014. —Adaptation to mTOR Kinase Inhibitors by Amplification of eIF4E to Maintain Cap-Dependent Translation.” *Journal of Cell Science* 127 (4): 788–800. doi:10.1242/jcs.137588.
- Dawra, Rajinder, Raghuwansh P. Sah, Vikas Dudeja, Loveena Rishi, Rupjoyti Talukdar, Pramod Garg, and Ashok K. Saluja. 2011. —Intra-Acinar Trypsinogen Activation Mediates Early Stages of Pancreatic Injury but Not Inflammation in Mice With Acute Pancreatitis.” *Gastroenterology* 141 (6): 2210–2217.e2. doi:10.1053/j.gastro.2011.08.033.
- DelGiorno, Kathleen E., Jason C. Hall, Kenneth K. Takeuchi, Fong Cheng Pan, Christopher J. Halbrook, M. Kay Washington, Kenneth P. Olive, et al. 2014. —Identification and Manipulation of Biliary Metaplasia in Pancreatic Tumors.” *Gastroenterology* 146 (1): 233–244.e5. doi:10.1053/j.gastro.2013.08.053.
- DeNicola, Gina M., Florian A. Karreth, David J. Adams, and Chi C. Wong. 2015. —The Utility of Transposon Mutagenesis for Cancer Studies in the Era of Genome Editing.” *Genome Biology* 16 (1). doi:10.1186/s13059-015-0794-y.
- Dowling, R. J., I. Topisirovic, T. Alain, M. Bidinosti, B. D. Fonseca, E. Petroulakis, X. Wang, et al. 2010. —mTORC1-Mediated Cell Proliferation, but Not Cell Growth, Controlled by the 4E-BPs.” *Science* 328 (May): 1172–76. doi:10.1126/science.1187532.
- Dowling, Ryan J. O., Ivan Topisirovic, Tommy Alain, Michael Bidinosti, Bruno D. Fonseca, Emmanuel Petroulakis, Xiaoshan Wang, et al. 2010. —mTORC1-Mediated Cell Proliferation, But Not Cell Growth, Controlled by the 4E-BPs.” *Science* 328 (5982): 1172–76. doi:10.1126/science.1187532.
- Eser, Stefan, Nina Reiff, Marlena Messer, Barbara Seidler, Kathleen Gottschalk, Melanie Dobler, Maren Hieber, et al. 2013. —Selective Requirement of PI3K/PDK1 Signaling for Kras Oncogene-Driven Pancreatic Cell Plasticity and Cancer.” *Cancer Cell* 23 (3): 406–20. doi:10.1016/j.ccr.2013.01.023.
- Faller, William J., Thomas J. Jackson, John R. P. Knight, Rachel A. Ridgway, Thomas Jamieson, Saadia A. Karim, Carolyn Jones, et al. 2015. —mTORC1-Mediated Translational Elongation Limits Intestinal Tumour Initiation and Growth.” *Nature* 517 (7535): 497–500. doi:10.1038/nature13896.
- Feldman, M. E., B. Apsel, A. Uotila, R. Loewith, Z. A. Knight, D. Ruggero, and K. M. Shokat. 2009. —Active-Site Inhibitors of mTOR Target Rapamycin-Resistant Outputs of mTORC1 and mTORC2.” *PLoS Biol* 7 (February): e38. doi:10.1371/journal.pbio.1000038.

- Feng, Zhaohui, Haiyan Zhang, Arnold J. Levine, and Shengkan Jin. 2005. —The Coordinate Regulation of the p53 and mTOR Pathways in Cells.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (23): 8204–9. doi:10.1073/pnas.0502857102.
- Feoktistova, Kateryna, Enkhee Tuvshintogs, Angelie Do, and Christopher S. Fraser. 2013. —Human eIF4E Promotes mRNA Restructuring by Stimulating eIF4A Helicase Activity.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110 (33): 13339–44. doi:10.1073/pnas.1303781110.
- Figura, Guido von, John P. Morris, Christopher V. E. Wright, and Matthias Hebrok. 2014. —Nr52a Maintains Acinar Cell Differentiation and Constrains Oncogenic Kras-Mediated Pancreatic Neoplastic Initiation.” *Gut* 63 (4): 656–64. doi:10.1136/gutjnl-2012-304287.
- Friedlander, Sharon Y. Gidekel, Gerald C. Chu, Eric L. Snyder, Nomeda Girnius, Gregory Dibelius, Denise Crowley, Eliza Vasile, Ronald A. DePinho, and Tyler Jacks. 2009. —Context-Dependent Transformation of Adult Pancreatic Cells by Oncogenic K-Ras.” *Cancer Cell* 16 (5): 379–89. doi:10.1016/j.ccr.2009.09.027.
- Furic, Luc, Liwei Rong, Ola Larsson, Ismaël Hervé Koumakpayi, Kaori Yoshida, Andrea Brueschke, Emmanuel Petroulakis, et al. 2010. —eIF4E Phosphorylation Promotes Tumorigenesis and Is Associated with Prostate Cancer Progression.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (32): 14134–39. doi:10.1073/pnas.1005320107.
- Gandin, Valentina, Laia Masvidal, Laura Hulea, Simon-Pierre Gravel, Marie Cargnello, Shannon McLaughlan, Yutian Cai, et al. 2016. —mCAGE Reveals 5' UTR Features That Define Specific Modes of Translation of Functionally Related MTOR-Sensitive mRNAs.” *Genome Research* 26 (5): 636–48. doi:10.1101/gr.197566.115.
- Garrido-Laguna, I., A. C. Tan, M. Uson, M. Angenendt, W. W. Ma, M. C. Villaroel, M. Zhao, et al. 2010. —Integrated Preclinical and Clinical Development of mTOR Inhibitors in Pancreatic Cancer.” *British Journal of Cancer* 103 (5): 649–55. doi:10.1038/sj.bjc.6605819.
- Ghazalpour, Anatole, Brian Bennett, Vladislav A. Petyuk, Luz Orozco, Raffi Hagopian, Imran N. Mungrue, Charles R. Farber, et al. 2011. —Comparative Analysis of Proteome and Transcriptome Variation in Mouse.” *PLOS Genet* 7 (6): e1001393. doi:10.1371/journal.pgen.1001393.
- Giardiello, Francis M., Jill D. Brensinger, Anne C. Tersmette, Steven N. Goodman, Gloria M. Petersen, Susan V. Booker, Marcia Cruz-Correa, and Johan A. Offerhaus. 2000. —Very High Risk of Cancer in Familial Peutz-Jeghers Syndrome.” *Gastroenterology* 119 (6): 1447–53. doi:10.1053/gast.2000.20228.
- Gingras, Anne-Claude, Brian Raught, Steven P. Gygi, Anna Niedzwiecka, Mathieu Miron, Stephen K. Burley, Roberto D. Polakiewicz, Aleksandra Wyslouch-Cieszyńska, Ruedi Aebersold, and Nahum Sonenberg. 2001. —Hierarchical Phosphorylation of the Translation Inhibitor 4E-BP1.” *Genes & Development* 15 (21): 2852–64. doi:10.1101/gad.912401.
- Grady, T, P Liang, SA Ernst, and CD Logsdon. 1997. —Chemokine Gene Expression in Rat Pancreatic Acinar Cells Is an Early Event Associated with Acute Pancreatitis.” *Gastroenterology* 113 (6): 1966–75. doi:10.1016/S0016-5085(97)70017-9.
- Graff, Jeremy R., Bruce W. Konicek, Thomas M. Vincent, Rebecca L. Lynch, David Monteith, Spring N. Weir, Phil Schwier, et al. 2007. —Therapeutic Suppression of Translation Initiation Factor eIF4E Expression Reduces Tumor Growth without Toxicity.” *Journal of Clinical Investigation* 117 (9): 2638–48. doi:10.1172/JCI32044.
- Grzmil, Michal, Jan Seebacher, Daniel Hess, Martin Behe, Roger Schibli, Gerald Moncayo, Stephan Frank, and Brian A. Hemmings. 2016. —Inhibition of MNK Pathways Enhances Cancer Cell Response to Chemotherapy with Temozolomide and Targeted Radionuclide Therapy.” *Cellular Signalling* 28 (9): 1412–21. doi:10.1016/j.cellsig.2016.06.005.
- Gu, Guoqiang, Jolanta Dubauskaite, and Douglas A. Melton. 2002. —Direct Evidence for the Pancreatic Lineage: NGN3+ Cells Are Islet Progenitors and Are Distinct from Duct Progenitors.” *Development* 129 (10): 2447–57.
- Guerra, Carmen, Alberto J. Schuhmacher, Marta Cañamero, Paul J. Grippo, Lena Verdaguer, Lucía Pérez-Gallego, Pierre Dubus, Eric P. Sandgren, and Mariano Barbacid. 2007. —Chronic Pancreatitis Is Essential for Induction of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma by K-Ras Oncogenes in Adult Mice.” *Cancer Cell* 11 (3): 291–302. doi:10.1016/j.ccr.2007.01.012.

- Halangk, Walter, Markus M. Lerch, Barbara Brandt-Nedelev, Wera Roth, Manuel Ruthenbuerger, Thomas Reinheckel, Wolfram Domschke, Hans Lippert, Christoph Peters, and Jan Deussing. 2000. —Role of Cathepsin B in Intracellular Trypsinogen Activation and the Onset of Acute Pancreatitis." *Journal of Clinical Investigation* 106 (6): 773–81. doi:10.1172/JCI9411.
- Hammel, Pascal, Cindy Neuzillet, Sihem Bendaoud, Céline Lekhal, Louis de Mestier, and Olivia Hentic. 2015. —Traitement Médical Du Cancer Du Pancréas : En 10 Ans, Enfin Des Progrès." *Bulletin Du Cancer*, 2e Congrès de la Société Française du Cancer, 102 (6, Supplement 1): S62–71. doi:10.1016/S0007-4551(15)31219-4.
- Hill, Reginald, Joseph Hargan Calvopina, Christine Kim, Ying Wang, David W. Dawson, Timothy R. Donahue, Sarah Dry, and Hong Wu. 2010. —PTEN Loss Accelerates KrasG12D-Induced Pancreatic Cancer Development." *Cancer Research* 70 (18): 7114–24. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-1649.
- Hingorani, Sunil R., Emanuel F. Petricoin III, Anirban Maitra, Vinodh Rajapakse, Catrina King, Michael A. Jacobetz, Sally Ross, et al. 2003a. —Preinvasive and Invasive Ductal Pancreatic Cancer and Its Early Detection in the Mouse." *Cancer Cell* 4 (6): 437–50. doi:10.1016/S1535-6108(03)00309-X.
- . 2003b. —Preinvasive and Invasive Ductal Pancreatic Cancer and Its Early Detection in the Mouse." *Cancer Cell* 4 (6): 437–50. doi:10.1016/S1535-6108(03)00309-X.
- Hingorani, Sunil R., Lifu Wang, Asha S. Multani, Chelsea Combs, Therese B. Deramandt, Ralph H. Hruban, Anil K. Rustgi, Sandy Chang, and David A. Tuveson. 2005. —Trp53R172H and KrasG12D Cooperate to Promote Chromosomal Instability and Widely Metastatic Pancreatic Ductal Adenocarcinoma in Mice." *Cancer Cell* 7 (5): 469–83. doi:10.1016/j.ccr.2005.04.023.
- Houbracken, Isabelle, Evelien de Waele, Jessy Lardon, Zhidong Ling, Harry Heimberg, Ilse Rooman, and Luc Bouwens. 2011. —Lineage Tracing Evidence for Transdifferentiation of Acinar to Duct Cells and Plasticity of Human Pancreas." *Gastroenterology* 141 (2): 731–741.e4. doi:10.1053/j.gastro.2011.04.050.
- Hsieh, Andrew C., Maria Costa, Ornella Zollo, Cole Davis, Morris E. Feldman, Joseph R. Testa, Oded Meyuhas, Kevan M. Shokat, and Davide Ruggero. 2010. —Genetic Dissection of the Oncogenic mTOR Pathway Reveals Druggable Addiction to Translational Control via 4EBP-eIF4E." *Cancer Cell* 17 (3): 249–61. doi:10.1016/j.ccr.2010.01.021.
- Hsieh, Andrew C., Yi Liu, Merritt P. Edlind, Nicholas T. Ingolia, Matthew R. Janes, Annie Sher, Evan Y. Shi, et al. 2012. —The Translational Landscape of mTOR Signalling Steers Cancer Initiation and Metastasis." *Nature* 485 (7396): 55–61. doi:10.1038/nature10912.
- Huang, Haojie, Yan Liu, Jaroslaw Daniluk, Sebastian Gaiser, Jun Chu, Huamin Wang, Zhao-Shen Li, Craig D. Logsdon, and Baoan Ji. 2013. —Activation of Nuclear Factor- κ B in Acinar Cells Increases the Severity of Pancreatitis in Mice." *Gastroenterology* 144 (1): 202–10. doi:10.1053/j.gastro.2012.09.059.
- Hurwitz, Herbert I., Nikhil Uppal, Stephanie A. Wagner, Johanna C. Bendell, J. Thaddeus Beck, Seaborn M. Wade, John J. Nemunaitis, et al. 2015. —Randomized, Double-Blind, Phase II Study of Ruxolitinib or Placebo in Combination With Capecitabine in Patients With Metastatic Pancreatic Cancer for Whom Therapy With Gemcitabine Has Failed." *Journal of Clinical Oncology* 33 (34): 4039–47. doi:10.1200/JCO.2015.61.4578.
- Ijichi, Hideaki, Anna Chytil, Agnieszka E. Gorska, Mary E. Aakre, Yoshio Fujitani, Shuko Fujitani, Christopher V. E. Wright, and Harold L. Moses. 2006. —Aggressive Pancreatic Ductal Adenocarcinoma in Mice Caused by Pancreas-Specific Blockade of Transforming Growth Factor- β Signaling in Cooperation with Active Kras Expression." *Genes & Development* 20 (22): 3147–60. doi:10.1101/gad.1475506.
- Ilic, Nina, Tamara Utermark, Hans R. Widlund, and Thomas M. Roberts. 2011. —PI3K-Targeted Therapy Can Be Evaded by Gene Amplification along the MYC-Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E (eIF4E) Axis." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108 (37): E699–708. doi:10.1073/pnas.1108237108.
- Infante, Jeffrey R., Bradley G. Somer, Joon Oh Park, Chung-Pin Li, Max E. Scheulen, Saifuddin M. Kasubhai, Do-Youn Oh, et al. 2014. —A Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial of Trametinib, an Oral MEK Inhibitor, in Combination with Gemcitabine for Patients with

- Untreated Metastatic Adenocarcinoma of the Pancreas." *European Journal of Cancer* 50 (12): 2072–81. doi:10.1016/j.ejca.2014.04.024.
- Ingolia, Nicholas T., Sina Ghaemmamghami, John R. S. Newman, and Jonathan S. Weissman. 2009. —Genome-Wide Analysis in Vivo of Translation with Nucleotide Resolution Using Ribosome Profiling." *Science* 324 (5924): 218–23. doi:10.1126/science.1168978.
- Inoki, Ken, Yong Li, Tian Xu, and Kun-Liang Guan. 2003. —Rheb GTPase Is a Direct Target of TSC2 GAP Activity and Regulates mTOR Signaling." *Genes & Development* 17 (15): 1829–34. doi:10.1101/gad.1110003.
- Iwasaki, Shintaro, Stephen N. Floor, and Nicholas T. Ingolia. 2016. —Raglates Convert DEAD-Box Protein eIF4A into a Sequence-Selective Translational Repressor." *Nature* 534 (7608): 558–61. doi:10.1038/nature17978.
- Izeradjene, Kamel, Chelsea Combs, Melissa Best, Aarthi Gopinathan, Amary Wagner, William M. Grady, Chu-Xia Deng, et al. 2007. —KrasG12D and Smad4/Dpc4 Haploinsufficiency Cooperate to Induce Mucinous Cystic Neoplasms and Invasive Adenocarcinoma of the Pancreas." *Cancer Cell* 11 (3): 229–43. doi:10.1016/j.ccr.2007.01.017.
- Jackson, Erica L., Nicholas Willis, Kim Mercer, Roderick T. Bronson, Denise Crowley, Raymond Montoya, Tyler Jacks, and David A. Tuveson. 2001. —Analysis of Lung Tumor Initiation and Progression Using Conditional Expression of Oncogenic K-Ras." *Genes & Development* 15 (24): 3243–48. doi:10.1101/gad.943001.
- Jacquemin, Patrick, Frédéric P Lemaigre, and Guy G Rousseau. 2003. —The Onecut Transcription Factor HNF-6 (OC-1) Is Required for Timely Specification of the Pancreas and Acts Upstream of Pdx-1 in the Specification Cascade." *Developmental Biology* 258 (1): 105–16. doi:10.1016/S0012-1606(03)00115-5.
- Jacquemin, Patrick, Hideyuki Yoshitomi, Yasushige Kashima, Guy G. Rousseau, Frederic P. Lemaigre, and Kenneth S. Zaret. 2006. —An Endothelial–mesenchymal Relay Pathway Regulates Early Phases of Pancreas Development." *Developmental Biology* 290 (1): 189–99. doi:10.1016/j.ydbio.2005.11.023.
- Janisch, Nigeen, and Timothy Gardner. 2015. —Recent Advances in Managing Acute Pancreatitis." *F1000Research*, December. doi:10.12688/f1000research.7172.1.
- Jefferies, H B, C Reinhard, S C Kozma, and G Thomas. 1994. —Rapamycin Selectively Represses Translation of The 'polypyrimidine tract' mRNA Family." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 (10): 4441–45.
- Jensen, Jan Nygaard, Erin Cameron, Maria Veronica R. Garay, Thomas W. Starkey, Roberto Gianani, and Jan Jensen. 2005. —Recapitulation of Elements of Embryonic Development in Adult Mouse Pancreatic Regeneration." *Gastroenterology* 128 (3): 728–41. doi:10.1053/j.gastro.2004.12.008.
- Jia, Di, Yan Sun, and Stephen F. Konieczny. 2008. —Mtf1 Regulates Pancreatic Acinar Cell Proliferation through p21 CIP1/WAF1." *Gastroenterology* 135 (5): 1687–97. doi:10.1053/j.gastro.2008.07.026.
- Jones, Siân, Xiaosong Zhang, D. Williams Parsons, Jimmy Cheng-Ho Lin, Rebecca J. Leary, Philipp Angenendt, Parminder Mankoo, et al. 2008. —Core Signaling Pathways in Human Pancreatic Cancers Revealed by Global Genomic Analyses." *Science* 321 (5897): 1801–6. doi:10.1126/science.1164368.
- Jonsson, J, L Carlsson, T Edlund, and H Edlund. 1994. —Insulin-Promoter-Factor 1 Is Required for Pancreas Development in Mice." *Nature* 371 (6498): 606–9. doi:10.1038/371606a0.
- Kapoor, Avnish, Wantong Yao, Haoqiang Ying, Sujun Hua, Alison Liewen, Qiuyun Wang, Yi Zhong, et al. 2014. —Yap Activation Enables Bypass of Oncogenic Kras Addiction in Pancreatic Cancer." *Cell* 158 (1): 185–97. doi:10.1016/j.cell.2014.06.003.
- Karim, Muhammad M., Yuri V. Svitkin, Avak Kahvejian, Gregory De Crescenzo, Mauro Costa-Mattioli, and Nahum Sonenberg. 2006. —A Mechanism of Translational Repression by Competition of Paip2 with eIF4G for poly(A) Binding Protein (PABP) Binding." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103 (25): 9494–99. doi:10.1073/pnas.0603701103.
- Kawaguchi, Yoshiya, Bonnie Cooper, Maureen Gannon, Michael Ray, Raymond J MacDonald, and Christopher V E Wright. 2002. —The Role of the Transcriptional Regulator Ptf1a in

- Converting Intestinal to Pancreatic Progenitors." *Nature Genetics* 32 (1): 128–34. doi:10.1038/ng959.
- Kentsis, A., I. Topisirovic, B. Culjkovic, L. Shao, and K. L. Borden. 2004. —Ribairin Suppresses eIF4E-Mediated Oncogenic Transformation by Physical Mimicry of the 7-Methyl Guanosine mRNA Cap." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (December): 18105–10. doi:10.1073/pnas.0406927102.
- Khalaileh, Abed, Avigail Dreazen, Areej Khatib, Roy Apel, Avital Swisa, Norma Kidess-Bassir, Anirban Maitra, Oded Meyuhas, Yuval Dor, and Gideon Zamir. 2013. —Phosphorylation of Ribosomal Protein S6 Attenuates DNA Damage and Tumor Suppression during Development of Pancreatic Cancer." *Cancer Research* 73 (6): 1811–20. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-2014.
- Király, Orsolya, Arnaud Boulling, Heiko Witt, Cédric Le Maréchal, Jian-Min Chen, Jonas Rosendahl, Cinzia Battaglia, Thomas Wartmann, Miklós Sahin-Tóth, and Claude Férec. 2007. —Signal Peptide Variants That Impair Secretion of Pancreatic Secretory Trypsin Inhibitor (SPINK1) Cause Autosomal Dominant Hereditary Pancreatitis." *Human Mutation* 28 (5): 469–76. doi:10.1002/humu.20471.
- Konicek, Bruce W., Jennifer R. Stephens, Ann M. McNulty, Nathaniel Robichaud, Robert B. Peery, Chad A. Dumstorf, Michele S. Dowless, et al. 2011. —Therapeutic Inhibition of MAP Kinase Interacting Kinase Blocks Eukaryotic Initiation Factor 4E Phosphorylation and Suppresses Outgrowth of Experimental Lung Metastases." *Cancer Research* 71 (5): 1849–57. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-3298.
- Kopinke, Daniel, Marisa Brailsford, Jill E. Shea, Rebecca Leavitt, Courtney L. Scaife, and L. Charles Murtaugh. 2011. —Lineage Tracing Reveals the Dynamic Contribution of Hes1+ Cells to the Developing and Adult Pancreas." *Development* 138 (3): 431–41. doi:10.1242/dev.053843.
- Kopp, Janel L., Claire L. Dubois, Ashleigh E. Schaffer, Ergeng Hao, Hung Ping Shih, Philip A. Seymour, Jenny Ma, and Maike Sander. 2011. —Sox9+ Ductal Cells Are Multipotent Progenitors throughout Development but Do Not Produce New Endocrine Cells in the Normal or Injured Adult Pancreas." *Development* 138 (4): 653–65. doi:10.1242/dev.056499.
- Kopp, Janel L., Guido von Figura, Erin Mayes, Fen-Fen Liu, Claire L. Dubois, John P. Morris IV, Fong Cheng Pan, et al. 2012. —Identification of Sox9-Dependent Acinar-to-Ductal Reprogramming as the Principal Mechanism for Initiation of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma." *Cancer Cell* 22 (6): 737–50. doi:10.1016/j.ccr.2012.10.025.
- Koromilas, A E, A Lazaris-Karatzas, and N Sonenberg. 1992. —mRNAs Containing Extensive Secondary Structure in Their 5' Non-Coding Region Translate Efficiently in Cells Overexpressing Initiation Factor eIF-4E." *The EMBO Journal* 11 (11): 4153–58.
- Laklai, Hanane, Yekaterina A. Miroshnikova, Michael W. Pickup, Eric A. Collisson, Grace E. Kim, Alex S. Barrett, Ryan C. Hill, et al. 2016. —Genotype Tunes Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Tissue Tension to Induce Matricellular Fibrosis and Tumor Progression." *Nature Medicine* 22 (5): 497–505. doi:10.1038/nm.4082.
- Lammert, Eckhard, Ondine Cleaver, and Douglas Melton. 2001. —Induction of Pancreatic Differentiation by Signals from Blood Vessels." *Science* 294 (5542): 564–67. doi:10.1126/science.1064344.
- Laplanche, Mathieu, and David M. Sabatini. 2012. —mTOR Signaling in Growth Control and Disease." *Cell* 149 (2): 274–93. doi:10.1016/j.cell.2012.03.017.
- Larsson, Ola, Masahiro Morita, Ivan Topisirovic, Tommy Alain, Marie-Jose Blouin, Michael Pollak, and Nahum Sonenberg. 2012. —Distinct Perturbation of the Translatome by the Antidiabetic Drug Metformin." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109 (23): 8977–82. doi:10.1073/pnas.1201689109.
- Larsson, Ola, Nahum Sonenberg, and Robert Nadon. 2010. —Identification of Differential Translation in Genome Wide Studies." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (50): 21487–92. doi:10.1073/pnas.1006821107.
- Lazaris-Karatzas, Anthoula, Kathleen S. Montine, and Nahum Sonenberg. 1990. —Malignant Transformation by a Eukaryotic Initiation Factor Subunit That Binds to mRNA 5' Cap." *Nature* 345 (6275): 544–47. doi:10.1038/345544a0.

- Le Bacquer, Olivier, Emmanuel Petroulakis, Sabina Paglialunga, Francis Poulin, Denis Richard, Katherine Cianflone, and Nahum Sonenberg. 2007. —~~E~~levated Sensitivity to Diet-Induced Obesity and Insulin Resistance in Mice Lacking 4E-BP1 and 4E-BP2.” *The Journal of Clinical Investigation* 117 (2): 387–96. doi:10.1172/JCI29528.
- Lee, Amy S. Y., Philip J. Kranzusch, Jennifer A. Doudna, and Jamie H. D. Cate. 2016. —~~E~~F3d Is an mRNA Cap-Binding Protein That Is Required for Specialized Translation Initiation.” *Nature* 536 (7614): 96–99. doi:10.1038/nature18954.
- Li, Shui, Yan Jia, Blake Jacobson, Joel McCauley, Robert Kratzke, Peter B. Bitterman, and Carston R. Wagner. 2013. —~~T~~reatment of Breast and Lung Cancer Cells with a N-7 Benzyl Guanosine Monophosphate Tryptamine Phosphoramidate Pronucleotide (4Ei-1) Results in Chemosensitization to Gemcitabine and Induced eIF4E Proteasomal Degradation.” *Molecular Pharmaceutics* 10 (2): 523–31. doi:10.1021/mp300699d.
- Li, Zhixing, Pradip Manna, Hiroyuki Kobayashi, Troy Spilde, Amina Bhatia, Barry Preuett, Krishna Prasad, Mark Hembree, and George K. Gittes. 2004. —~~M~~ultifaceted Pancreatic Mesenchymal Control of Epithelial Lineage Selection.” *Developmental Biology* 269 (1): 252–63. doi:10.1016/j.ydbio.2004.01.043.
- Lock, Rebecca, Rachel Ingraham, Ophélie Maertens, Abigail L. Miller, Nelly Weledji, Eric Legius, Bruce M. Konicek, Sau-Chi B. Yan, Jeremy R. Graff, and Karen Cichowski. 2016. —~~C~~o-targeting MNK and MEK Kinases Induces the Regression of *NF1*-Mutant Cancers.” *The Journal of Clinical Investigation* 126 (6): 2181–90. doi:10.1172/JCI85183.
- Logsdon, Craig D., and Baoan Ji. 2013. —~~T~~he Role of Protein Synthesis and Digestive Enzymes in Acinar Cell Injury.” *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* 10 (6): 362–70. doi:10.1038/nrgastro.2013.36.
- Maire, F., P. Lévy, V. Rebours, P. Hammel, and P. Ruszniewski. 2009. —~~D~~ La Pancréatite Chronique Aux Pancréatites Chroniques.” *Gastroentérologie Clinique et Biologique* 33 (8–9): 725–36. doi:10.1016/j.gcb.2009.07.017.
- Mallya, Sharmila, Briana A. Fitch, J. Scott Lee, Lomon So, Matthew R. Janes, and David A. Fruman. 2014. —~~R~~esistance to mTOR Kinase Inhibitors in Lymphoma Cells Lacking 4EBP1.” *PLOS ONE* 9 (2): e88865. doi:10.1371/journal.pone.0088865.
- Mann, Karen M., Jerrold M. Ward, Christopher Chin Kuan Yew, Anne Kovochich, David W. Dawson, Michael A. Black, Benjamin T. Brett, et al. 2012. —~~E~~eping Beauty Mutagenesis Reveals Cooperating Mutations and Pathways in Pancreatic Adenocarcinoma.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109 (16): 5934–41. doi:10.1073/pnas.1202490109.
- Maresch, Roman, Sebastian Mueller, Christian Veltkamp, Rupert Öllinger, Mathias Friedrich, Irina Heid, Katja Steiger, et al. 2016. —~~M~~ultiplexed Pancreatic Genome Engineering and Cancer Induction by Transfection-Based CRISPR/Cas9 Delivery in Mice.” *Nature Communications* 7: 10770. doi:10.1038/ncomms10770.
- Martineau, Y., R. Azar, C. Bousquet, and S. Pyronnet. 2013. —~~A~~n-Oncogenic Potential of the eIF4E-Binding Proteins.” *Oncogene* 32 (6): 671–77. doi:10.1038/nc.2012.116.
- Martineau, Y., R. Azar, D. Müller, C. Lasfargues, S. El Khawand, R. Anesia, J. Pelletier, C. Bousquet, and S. Pyronnet. 2013. —~~P~~ancreatic Tumours Escape from Translational Control through 4E-BP1 Loss.” *Oncogene*, April. doi:10.1038/nc.2013.100.
- Martineau, Y., M. C. Derry, X. Wang, A. Yanagiya, J. J. Berlanga, A. B. Shyu, H. Imataka, K. Gehring, and N. Sonenberg. 2008. —~~P~~ly(A)-Binding Protein-Interacting Protein 1 Binds to Eukaryotic Translation Initiation Factor 3 to Stimulate Translation.” *Mol Cell Biol* 28 (November): 6658–67.
- Miralles, Francisco, Paul Czernichow, Keiichi Ozaki, Nobuyuki Itoh, and Raphael Scharfmann. 1999. —~~S~~ignaling through Fibroblast Growth Factor Receptor 2b Plays a Key Role in the Development of the Exocrine Pancreas.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96 (11): 6267–72. doi:10.1073/pnas.96.11.6267.
- Moerke, Nathan J., Huseyin Aktas, Han Chen, Sonia Cantel, Mikhail Y. Reibarkh, Amr Fahmy, John D. Gross, et al. 2007. —~~S~~mall-Molecule Inhibition of the Interaction between the Translation Initiation Factors eIF4E and eIF4G.” *Cell* 128 (2): 257–67. doi:10.1016/j.cell.2006.11.046.

- Moffitt, Richard A., Raoud Marayati, Elizabeth L. Flate, Keith E. Volmar, S. Gabriela Herrera Loeza, Katherine A. Hoadley, Naim U. Rashid, et al. 2015. —Virtual Microdissection Identifies Distinct Tumor- and Stroma-Specific Subtypes of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma.” *Nature Genetics* 47 (10): 1168–78. doi:10.1038/ng.3398.
- Moore, Malcolm J., David Goldstein, John Hamm, Arie Figer, Joel R. Hecht, Steven Gallinger, Heather J. Au, et al. 2007. —Erlotinib Plus Gemcitabine Compared With Gemcitabine Alone in Patients With Advanced Pancreatic Cancer: A Phase III Trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group.” *Journal of Clinical Oncology* 25 (15): 1960–66. doi:10.1200/JCO.2006.07.9525.
- Morran, Douglas C., Jianmin Wu, Nigel B. Jamieson, Agata Mrowinska, Gabriela Kalna, Saadia A. Karim, Amy Y. M. Au, et al. 2014. —Targeting mTOR Dependency in Pancreatic Cancer.” *Gut*, April, gutjnl-2013-306202. doi:10.1136/gutjnl-2013-306202.
- Motzer, Robert J., Bernard Escudier, Stéphane Oudard, Thomas E. Hutson, Camillo Porta, Sergio Bracarda, Viktor Grünwald, et al. 2008. —Efficacy of Everolimus in Advanced Renal Cell Carcinoma: A Double-Blind, Randomised, Placebo-Controlled Phase III Trial.” *The Lancet* 372 (9637): 449–56. doi:10.1016/S0140-6736(08)61039-9.
- Mulkeen, Abby L. 2006. —Less Common Neoplasms of the Pancreas.” *World Journal of Gastroenterology* 12 (20): 3180. doi:10.3748/wjg.v12.i20.3180.
- Müller, David, Charline Lasfargues, Sally El Khawand, Amandine Alard, Robert J. Schneider, Corinne Bousquet, Stéphane Pyronnet, and Yvan Martineau. 2013. —4EBP Restrains eIF4E Phosphorylation.” *Translation* 1 (2): e25819. doi:10.4161/trla.25819.
- Murtaugh, L. Charles, and Matthew D. Keefe. 2015. —Regeneration and Repair of the Exocrine Pancreas.” *Annual Review of Physiology* 77 (1): 229–49. doi:10.1146/annurev-physiol-021014-071727.
- Murtaugh, L. Charles, Ben Z. Stanger, Kristen M. Kwan, and Douglas A. Melton. 2003. —Notch Signaling Controls Multiple Steps of Pancreatic Differentiation.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (25): 14920–25. doi:10.1073/pnas.2436557100.
- Muthukrishnan, S., G. W. Both, Y. Furuichi, and A. J. Shatkin. 1975. —5-Terminal 7-Methylguanosine in Eukaryotic mRNA Is Required for Translation.” *Nature* 255 (5503): 33–37. doi:10.1038/255033a0.
- Navas, Carolina, Isabel Hernández-Porras, Alberto J. Schuhmacher, Maria Sibilía, Carmen Guerra, and Mariano Barbacid. 2012. —EGF Receptor Signaling Is Essential for K-Ras Oncogene-Driven Pancreatic Ductal Adenocarcinoma.” *Cancer Cell* 22 (3): 318–30. doi:10.1016/j.ccr.2012.08.001.
- Nishimori, Isao, Kiyomi Fujikawa-Adachi, Saburo Onishi, and Michael A. Hollingsworth. 1999. —Carnic Anhydrase in Human Pancreas: Hypotheses for the Pathophysiological Roles of CA Isozymes.” *Annals of the New York Academy of Sciences* 880 (1): 5–16. doi:10.1111/j.1749-6632.1999.tb09505.x.
- O’Brien, S., H. Kantarjian, M. Keating, M. Beran, C. Koller, L. E. Robertson, J. Hester, M. B. Rios, M. Andreeff, and M. Talpaz. 1995. —Homoharringtonine Therapy Induces Responses in Patients with Chronic Myelogenous Leukemia in Late Chronic Phase.” *Blood* 86 (9): 3322–26.
- Offield, M. F., T. L. Jetton, P. A. Labosky, M. Ray, R. W. Stein, M. A. Magnuson, B. L. Hogan, and C. V. Wright. 1996. —PDX-1 Is Required for Pancreatic Outgrowth and Differentiation of the Rostral Duodenum.” *Development* 122 (3): 983–95.
- Ohanna, Mickaël, Andrew K. Sobering, Thomas Lapointe, Lazaro Lorenzo, Christophe Praud, Emmanuel Petroulakis, Nahum Sonenberg, Paul A. Kelly, Athanassia Sotiropoulos, and Mario Pende. 2005. —Atrophy of S6K1/[minus]/[minus] Skeletal Muscle Cells Reveals Distinct mTOR Effectors for Cell Cycle and Size Control.” *Nature Cell Biology* 7 (3): 286–94. doi:10.1038/ncb1231.
- Olive, Kenneth P., Michael A. Jacobetz, Christian J. Davidson, Aarthi Gopinathan, Dominick McIntyre, Davina Honess, Basetti Madhu, et al. 2009. —Inhibition of Hedgehog Signaling Enhances Delivery of Chemotherapy in a Mouse Model of Pancreatic Cancer.” *Science* 324 (5933): 1457–61. doi:10.1126/science.1171362.

- Pause, Arnim, Graham J. Belsham, Anne-Claude Gingras, Olivier Donzé, Tai-An Lin, John C. Lawrence, and Nahum Sonenberg. 1994. —Insulin-Dependent Stimulation of Protein Synthesis by Phosphorylation of a Regulator of 5'-cap Function." *Nature* 371 (6500): 762–67. doi:10.1038/371762a0.
- Peixoto, Renata D., Maria Ho, Daniel J. Renouf, Howard J. Lim, Sharlene Gill, Jenny Y. Ruan, and Winson Y. Cheung. 2015. —Eligibility of Metastatic Pancreatic Cancer Patients for First-Line Palliative Intent Nab-Paclitaxel Plus Gemcitabine Versus FOLFIRINOX." *American Journal of Clinical Oncology*, April, 1. doi:10.1097/COC.0000000000000193.
- Pelletier, Jerry, and Nahum Sonenberg. 1985. —Insertion Mutagenesis to Increase Secondary Structure within the 5' Noncoding Region of a Eukaryotic mRNA Reduces Translational Efficiency." *Cell* 40 (3): 515–26. doi:10.1016/0092-8674(85)90200-4.
- Pende, Mario, Sara C. Kozma, Muriel Jaquet, Viola Oorschot, Rémy Burcelin, Yannick Le Marchand-Brustel, Judith Klumperman, Bernard Thorens, and George Thomas. 2000. —Hypoinsulinaemia, Glucose Intolerance and Diminished β -Cell Size in S6K1-Deficient Mice." *Nature* 408 (6815): 994–97. doi:10.1038/35050135.
- Pende, Mario, Sung Hee Um, Virginie Mieulet, Melanie Sticker, Valerie L. Goss, Jurgen Mestan, Matthias Mueller, Stefano Fumagalli, Sara C. Kozma, and George Thomas. 2004. —S6K α -/-/S6K β -/- Mice Exhibit Perinatal Lethality and Rapamycin-Sensitive 5'-Terminal Oligopyrimidine mRNA Translation and Reveal a Mitogen-Activated Protein Kinase-Dependent S6 Kinase Pathway." *Molecular and Cellular Biology* 24 (8): 3112–24. doi:10.1128/MCB.24.8.3112-3124.2004.
- Pérez-Mancera, Pedro A., Alistair G. Rust, Louise van der Weyden, Glen Kristiansen, Allen Li, Aaron L. Sarver, Kevin A. T. Silverstein, et al. 2012. —The Deubiquitinase USP9X Suppresses Pancreatic Ductal Adenocarcinoma." *Nature* 486 (7402): 266–70. doi:10.1038/nature11114.
- Petroulakis, E., A. Parsyan, R. J. Dowling, O. LeBacquer, Y. Martineau, M. Bidinosti, O. Larsson, et al. 2009. —p3-Dependent Translational Control of Senescence and Transformation via 4E-BPs." *Cancer Cell* 16 (November): 439–46. doi:10.1016/j.ccr.2009.09.025.
- Pettazzoni, Piergiorgio, Andrea Viale, Parantu Shah, Alessandro Carugo, Haoqiang Ying, Huamin Wang, Giannicola Genovese, et al. 2015. —Genetic Events That Limit the Efficacy of MEK and RTK Inhibitor Therapies in a Mouse Model of KRAS-Driven Pancreatic Cancer." *Cancer Research* 75 (6): 1091–1101. doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-1854.
- Phillips, P. A., J. A. McCarroll, S. Park, M.-J. Wu, R. Pirola, M. Korsten, J. S. Wilson, and M. V. Apte. 2003. —Rat Pancreatic Stellate Cells Secrete Matrix Metalloproteinases: Implications for Extracellular Matrix Turnover." *Gut* 52 (2): 275–82. doi:10.1136/gut.52.2.275.
- Ponnappa, Biddanda C., Jan B. Hoek, Alan J. Waring, and Emanuel Rubin. 1987. —Effect of Ethanol on Amylase Secretion and Cellular Calcium Homeostasis in Pancreatic Acini from Normal and Ethanol-Fed Rats." *Biochemical Pharmacology* 36 (1): 69–79. doi:10.1016/0006-2952(87)90383-2.
- Pourdehnad, Michael, Morgan L. Truitt, Imran N. Siddiqi, Gregory S. Ducker, Kevan M. Shokat, and Davide Ruggero. 2013. —Myc and mTOR Converge on a Common Node in Protein Synthesis Control That Confers Synthetic Lethality in Myc-Driven Cancers." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110 (29): 11988–93. doi:10.1073/pnas.1310230110.
- Proud, Christopher G. 2015. —Mks, eIF4E Phosphorylation and Cancer." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms, Translation and Cancer*, 1849 (7): 766–73. doi:10.1016/j.bbagrm.2014.10.003.
- Provenzano, Paolo P., Carlos Cuevas, Amy E. Chang, Vikas K. Goel, Daniel D. Von Hoff, and Sunil R. Hingorani. 2012. —Enzymatic Targeting of the Stroma Ablates Physical Barriers to Treatment of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma." *Cancer Cell* 21 (3): 418–29. doi:10.1016/j.ccr.2012.01.007.
- Pyronnet, Stéphane, Hiroaki Imataka, Anne-Claude Gingras, Rikiro Fukunaga, Tony Hunter, and Nahum Sonenberg. 1999. —Human Eukaryotic Translation Initiation Factor 4G (eIF4G) Recruits Mnk1 to Phosphorylate eIF4E." *The EMBO Journal* 18 (1): 270–79. doi:10.1093/emboj/18.1.270.
- Rad, Roland, Lena Rad, Wei Wang, Alexander Strong, Hannes Ponstingl, Iraad F. Bronner, Matthew Mayo, et al. 2015. —A Conditional piggyBac Transposition System for Genetic Screening in

- Mice Identifies Oncogenic Networks in Pancreatic Cancer.” *Nature Genetics* 47 (1): 47–56. doi:10.1038/ng.3164.
- Ramalingam, Senthilmurugan, Lalji Gediya, Andrew K. Kwegyir-Afful, Vidya P. Ramamurthy, Puranik Purushottamachar, Hannah Mbatia, Vincent C. O. Njar, et al. 2014. —First Mnk5 Degrading Agents Block Phosphorylation of eIF4E, Induce Apoptosis, Inhibit Cell Growth, Migration and Invasion in Triple Negative and Her2-Overexpressing Breast Cancer Cell Lines.” *Oncotarget* 5 (2): 530–43.
- Rebours, Vinciane, Marie-Christine Boutron-Ruault, Matthieu Schnee, Claude Férec, Frédérique Maire, Pascal Hammel, Philippe Ruszniewski, and Philippe Lévy. 2008. —Risks of Pancreatic Adenocarcinoma in Patients With Hereditary Pancreatitis: A National Exhaustive Series.” *The American Journal of Gastroenterology* 103 (1): 111–19. doi:10.1111/j.1572-0241.2007.01597.x.
- Rhim, Andrew D., Paul E. Oberstein, Dafydd H. Thomas, Emily T. Mirek, Carmine F. Palermo, Stephen A. Sastra, Erin N. Dekleva, et al. 2014. —Stromal Elements Act to Restrain, Rather Than Support, Pancreatic Ductal Adenocarcinoma.” *Cancer Cell* 25 (6): 735–47. doi:10.1016/j.ccr.2014.04.021.
- Robichaud, N., S. V. del Rincon, B. Huor, T. Alain, L. A. Petrucci, J. Hearnden, C. Goncalves, et al. 2014. —Phosphorylation of eIF4E Promotes EMT and Metastasis via Translational Control of SNAIL and MMP-3.” *Oncogene*. doi:10.1038/nc.2014.146.
- Rodolosse, Annie, Elisabet Chaux, Teresa Adell, Hélène Hagège, Anouchka Skoudy, and Francisco X Real. 2004. —p48 Transcription Factor Couples Proliferation and Differentiation in the Exocrine Pancreas [Corrected].” *Gastroenterology* 127 (3): 937–49.
- Rojo, F., L. Najera, J. Lirola, J. Jimenez, M. Guzman, M. D. Sabadell, J. Baselga, and S. Ramon y Cajal. 2007. —4EBinding Protein 1, a Cell Signaling Hallmark in Breast Cancer That Correlates with Pathologic Grade and Prognosis.” *Clin Cancer Res* 13 (January): 81–89. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-1560.
- Rosendahl, Jonas, Heiko Witt, Richárd Szmola, Eesh Bhatia, Béla Ózsvári, Olfert Landt, Hans-Ulrich Schulz, et al. 2008. —Chymotrypsin C (CTRC) Variants That Diminish Activity or Secretion Are Associated with Chronic Pancreatitis.” *Nature Genetics* 40 (1): 78–82. doi:10.1038/ng.2007.44.
- Rowley, Matthew, Akihiro Ohashi, Gourish Mondal, Lisa Mills, Lin Yang, Lizhi Zhang, Rhianna Sundsbak, et al. 2011. —Inactivation of Brca2 Promotes Trp53-Associated but Inhibits KrasG12D-Dependent Pancreatic Cancer Development in Mice.” *Gastroenterology* 140 (4): 1303–1313.e3. doi:10.1053/j.gastro.2010.12.039.
- Rubio, Claudia A, Benjamin Weisburd, Matthew Holderfield, Carolina Arias, Eric Fang, Joseph L DeRisi, and Abdallah Fanidi. 2014. —Transcriptome-Wide Characterization of the eIF4A Signature Highlights Plasticity in Translation Regulation.” *Genome Biology* 15 (10). doi:10.1186/s13059-014-0476-1.
- Ruggero, D., L. Montanaro, L. Ma, W. Xu, P. Londei, C. Cordon-Cardo, and P. P. Pandolfi. 2004. —The Translation Factor eIF-4E Promotes Tumor Formation and Cooperates with c-Myc in Lymphomagenesis.” *Nat Med* 10 (May): 484–86. doi:10.1038/nm1042.
- Rustgi, Anil K. 2014. —Familial Pancreatic Cancer: Genetic Advances.” *Genes & Development* 28 (1): 1–7. doi:10.1101/gad.228452.113.
- Ruvinsky, Igor, Nitzan Sharon, Tal Lerer, Hannah Cohen, Miri Stolovich-Rain, Tomer Nir, Yuval Dor, Philip Zisman, and Oded Meyuhas. 2005. —Ribosomal Protein S6 Phosphorylation Is a Determinant of Cell Size and Glucose Homeostasis.” *Genes & Development* 19 (18): 2199–2211. doi:10.1101/gad.351605.
- Sabatini, David M. 2006. —mTOR and Cancer: Insights into a Complex Relationship.” *Nature Reviews Cancer* 6 (9): 729–34. doi:10.1038/nrc1974.
- Sabatini, David M., Hediye Erdjument-Bromage, Mary Lui, Paul Tempst, and Solomon H. Snyder. 1994. —RAFT1: A Mammalian Protein That Binds to FKBP12 in a Rapamycin-Dependent Fashion and Is Homologous to Yeast TORs.” *Cell* 78 (1): 35–43. doi:10.1016/0092-8674(94)90570-3.
- Sabatini, David M., Brian A. Pierchala, Roxanne K. Barrow, Michael J. Schell, and Solomon H. Snyder. 1995. —The Rapamycin and FKBP12 Target (RAFT) Displays Phosphatidylinositol 4-

- Kinase Activity." *Journal of Biological Chemistry* 270 (36): 20875–78. doi:10.1074/jbc.270.36.20875.
- Saluja, A, M Saluja, A Villa, U Leli, P Rutledge, J Meldolesi, and M Steer. 1989. —Pancreatic Duct Obstruction in Rabbits Causes Digestive Zymogen and Lysosomal Enzyme Colocalization." *Journal of Clinical Investigation* 84 (4): 1260–66. doi:10.1172/JCI114293.
- Samuel, Nardin, and Thomas J. Hudson. 2012. —The Molecular and Cellular Heterogeneity of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma." *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* 9 (2): 77–87. doi:10.1038/nrgastro.2011.215.
- Sancak, Y., L. Bar-Peled, R. Zoncu, A. L. Markhard, S. Nada, and D. M. Sabatini. 2010. —Ragulator-Rag Complex Targets mTORC1 to the Lysosomal Surface and Is Necessary for Its Activation by Amino Acids." *Cell* 141 (April): 290–303. doi:10.1016/j.cell.2010.02.024.
- Santagata, Sandro, Marc L. Mendillo, Yun-chi Tang, Aravind Subramanian, Casey C. Perley, Stéphane P. Roche, Bang Wong, et al. 2013. —Fight Coordination of Protein Translation and HSF1 Activation Supports the Anabolic Malignant State." *Science* 341 (6143): 1238303. doi:10.1126/science.1238303.
- Schäfer, Claus, Sarah E. Ross, M. Julia Bragado, Guy E. Groblewski, Stephen A. Ernst, and John A. Williams. 1998. —A Role for the p38 Mitogen-Activated Protein Kinase/Hsp 27 Pathway in Cholecystokinin-Induced Changes in the Actin Cytoskeleton in Rat Pancreatic Acini." *Journal of Biological Chemistry* 273 (37): 24173–80. doi:10.1074/jbc.273.37.24173.
- Schaffer, Ashleigh E, Kristine K Freude, Shelley B Nelson, and Maike Sander. 2010. —Nk6 Transcription Factors and Ptf1a Function as Antagonistic Lineage Determinants in Multipotent Pancreatic Progenitors." *Developmental Cell* 18 (6): 1022–29. doi:10.1016/j.devcel.2010.05.015.
- Schönhuber, Nina, Barbara Seidler, Kathleen Schuck, Christian Veltkamp, Christina Schachtler, Magdalena Zukowska, Stefan Eser, et al. 2014. —A next-Generation Dual-Recombinase System for Time- and Host-Specific Targeting of Pancreatic Cancer." *Nature Medicine* advance online publication (October). doi:10.1038/nm.3646.
- Schwanhäusser, Björn, Dorothea Busse, Na Li, Gunnar Dittmar, Johannes Schuchhardt, Jana Wolf, Wei Chen, and Matthias Selbach. 2011. —Global Quantification of Mammalian Gene Expression Control." *Nature* 473 (7347): 337–42. doi:10.1038/nature10098.
- Serra, Violeta, Ben Markman, Maurizio Scaltriti, Pieter J. A. Eichhorn, Vanesa Valero, Marta Guzman, Maria Luisa Botero, et al. 2008. —NVP-BEZ235, a Dual PI3K/mTOR Inhibitor, Prevents PI3K Signaling and Inhibits the Growth of Cancer Cells with Activating PI3K Mutations." *Cancer Research* 68 (19): 8022–30. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-1385.
- Seymour, Philip A., Kristine K. Freude, Man N. Tran, Erin E. Mayes, Jan Jensen, Ralf Kist, Gerd Scherer, and Maike Sander. 2007. —SOX9 Is Required for Maintenance of the Pancreatic Progenitor Cell Pool." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (6): 1865–70. doi:10.1073/pnas.0609217104.
- She, Qing-Bai, Ensar Halilovic, Qing Ye, Wei Zhen, Senji Shirasawa, Takehiko Sasazuki, David B. Solit, and Neal Rosen. 2010. —4EBP1 Is a Key Effector of the Oncogenic Activation of the AKT and ERK Signaling Pathways That Integrates Their Function in Tumors." *Cancer Cell* 18 (1): 39–51. doi:10.1016/j.ccr.2010.05.023.
- Sherman, Mara H., Ruth T. Yu, Dannielle D. Engle, Ning Ding, Annette R. Atkins, Herve Tiriac, Eric A. Collisson, et al. 2014. —Vitamin D Receptor-Mediated Stromal Reprogramming Suppresses Pancreatitis and Enhances Pancreatic Cancer Therapy." *Cell* 159 (1): 80–93. doi:10.1016/j.cell.2014.08.007.
- Shih, Hung Ping, Janel L. Kopp, Manbir Sandhu, Claire L. Dubois, Philip A. Seymour, Anne Grapin-Botton, and Maike Sander. 2012. —A Notch-Dependent Molecular Circuitry Initiates Pancreatic Endocrine and Ductal Cell Differentiation." *Development* 139 (14): 2488–99. doi:10.1242/dev.078634.
- Slamon, Dennis J., Brian Leyland-Jones, Steven Shak, Hank Fuchs, Virginia Paton, Alex Bajamonde, Thomas Fleming, et al. 2001. —Use of Chemotherapy plus a Monoclonal Antibody against HER2 for Metastatic Breast Cancer That Overexpresses HER2." *New England Journal of Medicine* 344 (11): 783–92. doi:10.1056/NEJM200103153441101.

- Sonenberg, Nahum, and Alan G Hinnebusch. 2009. —Regulation of Translation Initiation in Eukaryotes: Mechanisms and Biological Targets.” *Cell* 136 (4): 731–45. doi:10.1016/j.cell.2009.01.042.
- Stromnes, Ingunn M., Thomas M. Schmitt, Ayaka Hulbert, J. Scott Brockenbrough, Hieu N. Nguyen, Carlos Cuevas, Ashley M. Dotson, et al. 2015. —T Cells Engineered against a Native Antigen Can Surmount Immunologic and Physical Barriers to Treat Pancreatic Ductal Adenocarcinoma.” *Cancer Cell* 28 (5): 638–52. doi:10.1016/j.ccell.2015.09.022.
- Svitkin, Y. V., A. Pause, A. Haghighat, S. Pyronnet, G. Witherell, G. J. Belsham, and N. Sonenberg. 2001. —The Requirement for Eukaryotic Initiation Factor 4A (eIF4A) in Translation Is in Direct Proportion to the Degree of mRNA 5’ Secondary Structure.” *Rna* 7 (March): 382–94.
- Svitkin, Yuri V., Akiko Yanagiya, Alexey E. Karetnikov, Tommy Alain, Marc R. Fabian, Arkady Khoutorsky, Sandra Perreault, Ivan Topisirovic, and Nahum Sonenberg. 2013. —Control of Translation and miRNA-Dependent Repression by a Novel Poly(A) Binding Protein, hnRNP-Q.” *PLOS Biol* 11 (5): e1001564. doi:10.1371/journal.pbio.1001564.
- Thoreen, Carson C., Lynne Chantranupong, Heather R. Keys, Tim Wang, Nathanael S. Gray, and David M. Sabatini. 2012. —A Unifying Model for mTORC1-Mediated Regulation of mRNA Translation.” *Nature* 485 (7396): 109–13. doi:10.1038/nature11083.
- Truitt, Morgan L., and Davide Ruggero. 2016. —NewFrontiers in Translational Control of the Cancer Genome.” *Nature Reviews Cancer* 16 (5): 288–304. doi:10.1038/nrc.2016.27.
- Truitt, Morgan L., Crystal S. Conn, Zhen Shi, Xiaming Pang, Taku Tokuyasu, Alison M. Coady, Youngho Seo, Maria Barna, and Davide Ruggero. 2015. —Differential Requirements for eIF4E Dose in Normal Development and Cancer.” *Cell*. Accessed July 1. doi:10.1016/j.cell.2015.05.049.
- Ueda, Takeshi, Masato Sasaki, Andrew J. Elia, Iok In Christine Chio, Koichi Hamada, Rikio Fukunaga, and Tak W. Mak. 2010. —Combined Deficiency for MAP Kinase-Interacting Kinase 1 and 2 (Mnk1 and Mnk2) Delays Tumor Development.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (32): 13984–90. doi:10.1073/pnas.1008136107.
- Van Cutsem, Eric, M. Hidalgo, and Bazin, Igor. 2016. —Phase II Randomized Trial of MEK Inhibitor Pimasertib or Placebo Combined with Gemcitabine in the First-Line Treatment of Metastatic Pancreatic Cancer.” *Journal of Clinical Oncology*. Accessed May 21. <http://meetinglibrary.asco.org/content/139531-158>.
- Vasen, H.f.a., N.a. Gruis, R.r. Frants, P.a. van der Velden, E.t.m. Hille, and W. Bergman. 2000. —Risk of Developing Pancreatic Cancer in Families with Familial Atypical Multiple Mole Melanoma Associated with a Specific 19 Deletion of p16 (p16-Leiden).” *International Journal of Cancer* 87 (6): 809–11. doi:10.1002/1097-0215(20000915)87:6<809::AID-IJC8>3.0.CO;2-U.
- Von Hoff, Daniel D., Thomas Ervin, Francis P. Arena, E. Gabriela Chiorean, Jeffrey Infante, Malcolm Moore, Thomas Seay, et al. 2013. —Increased Survival in Pancreatic Cancer with Nab-Paclitaxel plus Gemcitabine.” *New England Journal of Medicine* 369 (18): 1691–1703. doi:10.1056/NEJMoa1304369.
- Vonlaufen, Alain, Jeremy S Wilson, and Minoti V Apte. 2008. —Molecular Mechanisms of Pancreatitis: Current Opinion.” *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 23 (9): 1339–48. doi:10.1111/j.1440-1746.2008.05520.x.
- Waddell, Nicola, Marina Pajic, Ann-Marie Patch, David K. Chang, Karin S. Kassahn, Peter Bailey, Amber L. Johns, et al. 2015. —Whole Genomes Redefine the Mutational Landscape of Pancreatic Cancer.” *Nature* 518 (7540): 495–501. doi:10.1038/nature14169.
- Wang, Junfeng, Gamze Kilic, Muge Aydin, Zoe Burke, Guillermo Oliver, and Beatriz Sosa-Pineda. 2005. —Rbx1 Activity Controls Pancreas Morphogenesis and Participates in the Production of ‘secondary Transition’ Pancreatic Endocrine Cells.” *Developmental Biology* 286 (1): 182–94. doi:10.1016/j.ydbio.2005.07.021.
- Wang, Sui, Jingbo Yan, Daniel A. Anderson, Yanwen Xu, Maneesh C. Kanal, Zheng Cao, Christopher V. E. Wright, and Guoqiang Gu. 2010. —Neurog Gene Dosage Regulates Allocation of Endocrine and Exocrine Cell Fates in the Developing Mouse Pancreas.” *Developmental Biology* 339 (1): 26–37. doi:10.1016/j.ydbio.2009.12.009.

- Wang, Xuemin, Wei Li, Michayla Williams, Naohiro Terada, Dario R. Alessi, and Christopher G. Proud. 2001. —Regulation of Elongation Factor 2 Kinase by p90RSK1 and p70 S6 Kinase.” *The EMBO Journal* 20 (16): 4370–79. doi:10.1093/emboj/20.16.4370.
- Wei, Daoyan, Liang Wang, Yongmin Yan, Zhiliang Jia, Mihai Gagea, Zhiwei Li, Xiangsheng Zuo, Xiangyu Kong, Suyun Huang, and Keping Xie. 2016. —KLF4 Is Essential for Induction of Cellular Identity Change and Acinar-to-Ductal Reprogramming during Early Pancreatic Carcinogenesis.” *Cancer Cell* 29 (3): 324–38. doi:10.1016/j.ccell.2016.02.005.
- Weissmueller, Susann, Eusebio Manchado, Michael Saborowski, John P. Morris IV, Elvin Wagenblast, Carrie A. Davis, Sung-Hwan Moon, et al. 2014. —Mutant p53 Drives Pancreatic Cancer Metastasis through Cell-Autonomous PDGF Receptor β Signaling.” *Cell* 157 (2): 382–94. doi:10.1016/j.cell.2014.01.066.
- Wen, Qiuyuan, Weiyan Wang, Jiadi Luo, Shuzhou Chu, Lingjiao Chen, Lina Xu, Hongjing Zang, et al. 2016. —CD57380 Enhances Efficacy of RAD001 in Non-Small Cell Lung Cancer through Abrogating mTOR Inhibition-Induced Phosphorylation of eIF4E and Activating Mitochondrial Apoptotic Pathway.” *Oncotarget* 7 (19): 27787–801.
- Wendel, H. G., R. L. Silva, A. Malina, J. R. Mills, H. Zhu, T. Ueda, R. Watanabe-Fukunaga, et al. 2007. —Dissecting eIF4E Action in Tumorigenesis.” *Genes Dev* 21 (December): 3232–37.
- Whitcomb, David C., Michael C. Gorry, Robert A. Preston, William Furey, Michael J. Sossenheimer, Charles D. Ulrich, Stephen P. Martin, et al. 1996. —Hereditary Pancreatitis Is Caused by a Mutation in the Cationic Trypsinogen Gene.” *Nature Genetics* 14 (2): 141–45. doi:10.1038/ng1096-141.
- Whitcomb, David C, and Mark E Lowe. 2007. —Human Pancreatic Digestive Enzymes.” *Digestive Diseases and Sciences* 52 (1): 1–17. doi:10.1007/s10620-006-9589-z.
- Williams, John. 2010. —Regulation of Acinar Cell Function in the Pancreas.” *Current Opinion in Gastroenterology September 2010* 26 (5): 478–83. doi:10.1097/MOG.0b013e32833d11c6.
- Witkiewicz, Agnieszka K., Elizabeth A. McMillan, Uthra Balaji, GuemHee Baek, Wan-Chi Lin, John Mansour, Mehri Mollae, et al. 2015. —Whole-Exome Sequencing of Pancreatic Cancer Defines Genetic Diversity and Therapeutic Targets.” *Nature Communications* 6: 6744. doi:10.1038/ncomms7744.
- Wolfe, Andrew L., Kamini Singh, Yi Zhong, Philipp Drewe, Vinagolu K. Rajasekhar, Viraj R. Sanghvi, Konstantinos J. Mavrikakis, et al. 2014. —RNA G-Quadruplexes Cause eIF4A-Dependent Oncogene Translation in Cancer.” *Nature* 513 (7516): 65–70. doi:10.1038/nature13485.
- Wolpin, B. M., A. F. Hezel, T. Abrams, L. S. Blaszkowsky, J. A. Meyerhardt, J. A. Chan, P. C. Enzinger, et al. 2009. —The mTOR Inhibitor Everolimus in Patients with Gemcitabine-Refractory Metastatic Pancreatic Cancer.” *J Clin Oncol* 27 (January): 193–98.
- Wu, Chia-Yen C., Eileen S. Carpenter, Kenneth K. Takeuchi, Christopher J. Halbrook, Louise V. Peverley, Harold Bien, Jason C. Hall, et al. 2014. —PI3K Regulation of RAC1 Is Required for KRAS-Induced Pancreatic Tumorigenesis in Mice.” *Gastroenterology* 147 (6): 1405–1416.e7. doi:10.1053/j.gastro.2014.08.032.
- Xue, Shifeng, Siqi Tian, Kotaro Fujii, Wipapat Kladwang, Rhiju Das, and Maria Barna. 2015. —RNA Regulons in Hox 5' UTRs Confer Ribosome Specificity to Gene Regulation.” *Nature* 517 (7532): 33–38. doi:10.1038/nature14010.
- Xue, Wen, Sidi Chen, Hao Yin, Tuomas Tammela, Thales Papagiannakopoulos, Nikhil S. Joshi, Wenxin Cai, et al. 2014. —CRISPR-Mediated Direct Mutation of Cancer Genes in the Mouse Liver.” *Nature* 514 (7522): 380–84. doi:10.1038/nature13589.
- Yamaguchi, Suguru, Hisamitsu Ishihara, Takahiro Yamada, Akira Tamura, Masahiro Usui, Ryu Tominaga, Yuichiro Munakata, et al. 2008. —ATF4-Mediated Induction of 4E-BP1 Contributes to Pancreatic β Cell Survival under Endoplasmic Reticulum Stress.” *Cell Metabolism* 7 (3): 269–76. doi:10.1016/j.cmet.2008.01.008.
- Yan, Yifei, Yuri Svitkin, Joseph M. Lee, Martin Bisailon, and Jerry Pelletier. 2005. —Ribairin Is Not a Functional Mimic of the 7-Methyl Guanosine mRNA Cap.” *RNA* 11 (8): 1238–44. doi:10.1261/rna.2930805.
- Yanagiya, Akiko, Yuri V Svitkin, Shoichiro Shibata, Satoshi Mikami, Hiroaki Imataka, and Nahum Sonenberg. 2009. —Requirement of RNA Binding of Mammalian Eukaryotic Translation

- Initiation Factor 4GI (eIF4GI) for Efficient Interaction of eIF4E with the mRNA Cap.” *Molecular and Cellular Biology* 29 (6): 1661–69. doi:10.1128/MCB.01187-08.
- Ying, Haoqiang, Prasenjit Dey, Wantong Yao, Alec C. Kimmelman, Giulio F. Draetta, Anirban Maitra, and Ronald A. DePinho. 2016. —Genetics and Biology of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma.” *Genes & Development* 30 (4): 355–85. doi:10.1101/gad.275776.115.
- Ying, Haoqiang, Kutlu G. Elpek, Anant Vinjamoori, Stephanie M. Zimmerman, Gerald C. Chu, Haiyan Yan, Eliot Fletcher-Sananikone, et al. 2011. —PEN Is a Major Tumor Suppressor in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma and Regulates an NF-κB–Cytokine Network.” *Cancer Discovery* 1 (2): 158–69. doi:10.1158/2159-8290.CD-11-0031.
- Ying, Haoqiang, Alec C. Kimmelman, Costas A. Lyssiotis, Sujun Hua, Gerald C. Chu, Eliot Fletcher-Sananikone, Jason W. Locasale, et al. 2012. —Oncogenic Kras Maintains Pancreatic Tumors through Regulation of Anabolic Glucose Metabolism.” *Cell* 149 (3): 656–70. doi:10.1016/j.cell.2012.01.058.
- Yip, Calvin K., Kazuyoshi Murata, Thomas Walz, David M. Sabatini, and Seong A. Kang. 2010. —Structure of the Human mTOR Complex I and Its Implications for Rapamycin Inhibition.” *Molecular Cell* 38 (5): 768–74. doi:10.1016/j.molcel.2010.05.017.
- Zaninovic, Vjekoslav, Anna S. Gukovskaya, Ilya Gukovsky, Michelle Mouria, and Stephen J. Pandol. 2000. —Culein Upregulates ICAM-1 in Pancreatic Acinar Cells, Which Mediates Neutrophil Adhesion to These Cells.” *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* 279 (4): G666–76.
- Zhang, Yaqing, Wei Yan, Meredith A. Collins, Filip Bednar, Sabita Rakshit, Bruce R. Zetter, Ben Z. Stanger, Ivy Chung, Andrew D. Rhim, and Marina Pasca di Magliano. 2013. —Interleukin-6 Is Required for Pancreatic Cancer Progression by Promoting MAPK Signaling Activation and Oxidative Stress Resistance.” *Cancer Research* 73 (20): 6359–74. doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-1558-T.
- Zhou, Qiao, Anica C. Law, Jayaraj Rajagopal, William J. Anderson, Paul A. Gray, and Douglas A. Melton. 2007. —A Multipotent Progenitor Domain Guides Pancreatic Organogenesis.” *Developmental Cell* 13 (1): 103–14. doi:10.1016/j.devcel.2007.06.001.
- Zimmermann, Gunther, Björn Papke, Shehab Ismail, Nachiket Vartak, Anchal Chandra, Maike Hoffmann, Stephan A. Hahn, et al. 2013. —Small Molecule Inhibition of the KRAS-PDEδ Interaction Impairs Oncogenic KRAS Signalling.” *Nature* 497 (7451): 638–42. doi:10.1038/nature12205.

ANNEXES

ORIGINAL ARTICLE

Essential role for SphK1/S1P signaling to regulate hypoxia-inducible factor 2 α expression and activity in cancer

P Bouquerel^{1,2,3,7}, C Gstalder^{1,2,3,7}, D Müller^{3,4}, J Laurent^{1,2,3}, L Brizuela^{1,2,3}, RA Sabbadini⁵, B Malavaud^{1,2,3,6}, S Pyronnet^{3,4}, Y Martineau⁴, I Ader^{1,2,3,7} and O Cuvillier^{1,2,3,7}

The sphingosine kinase-1/sphingosine 1-phosphate (SphK1/S1P) signaling pathway has been reported to modulate the expression of the canonical transcription factor hypoxia-inducible HIF-1 α in multiple cell lineages. HIF-2 α is also frequently overexpressed in solid tumors but its role has been mostly studied in clear cell renal cell carcinoma (ccRCC), the most common form of kidney cancer, where HIF-2 α has been established as a driver of a more aggressive disease. In this study, the role of SphK1/S1P signaling with regard to HIF-2 α was investigated in various cancer cell models including ccRCC cells. Under hypoxic conditions or in ccRCC lacking a functional von Hippel-Lindau (VHL) gene and expressing high levels of HIF-2 α , SphK1 activity controls HIF-2 α expression and transcriptional activity through a phospholipase D (PLD)-driven mechanism. SphK1 silencing promotes a VHL-independent HIF-2 α loss of expression and activity and reduces cell proliferation in ccRCC. Importantly, downregulation of SphK1 is associated with impaired Akt and mTOR signaling in ccRCC. Taking advantage of a monoclonal antibody neutralizing extracellular S1P, we show that inhibition of S1P extracellular signaling blocks HIF-2 α accumulation in ccRCC cell lines, an effect mimicked when the S1P transporter Spns2 or the S1P receptor 1 (S1P₁) is silenced. Here, we report the first evidence that the SphK1/S1P signaling pathway regulates the transcription factor hypoxia-inducible HIF-2 α in diverse cancer cell lineages notably ccRCC, where HIF-2 α has been established as a driver of a more aggressive disease. These findings demonstrate that SphK1/S1P signaling may act as a canonical regulator of HIF-2 α expression in ccRCC, giving support to its inhibition as a therapeutic strategy that could contribute to reduce HIF-2 activity in ccRCC.

Oncogenesis (2016) 5, e209; doi:10.1038/oncsis.2016.13; published online 14 March 2016

INTRODUCTION

The bioactive sphingolipid sphingosine 1-phosphate (S1P) is a critical regulator of multifarious physiological and pathophysiological processes including cancer.^{1–3} S1P can be formed by the phosphorylation of sphingosine, the backbone of sphingolipids, and by the sphingosine kinase-1 (SphK1) isoform.⁴ S1P is a ligand for five high-affinity G protein-coupled receptors (S1P_{1–5}), with specific effects dictated by the expression pattern of S1P receptor subtypes expressed in a particular tissue.⁵ S1P is produced intracellularly and exerts its paracrine or autocrine effects by being secreted by specific transporters such as spinster 2 (Spns2).^{6–8} Alternative GPCR-independent signaling of S1P also exists⁹ with recent studies establishing direct modulation of intracellular proteins.^{10,11} In cancer, S1P metabolism is often dysregulated directing attention to the SphK1/S1P signaling pathway as a target for anticancer drug discovery.^{12–14} SphK1 expression is upregulated in tumors, and high SphK1 expression is correlated with a significant decrease in survival rate in patients with several forms of cancer.¹⁵ In some cases, as in ccRCC, plasma levels of S1P are substantially elevated compared with healthy control levels.¹⁶ A number of preclinical studies have established that pharmacological inhibition of SphK1 could be efficacious

in decreasing tumor size or sensitize to therapeutics.^{17–20} Interestingly, the anticancer activity of an anti-S1P monoclonal antibody (sphingomab),²¹ which neutralizes S1P and inhibits its extracellular signaling, provides evidence of the importance of exogenous S1P in mediating tumor growth and metastatic potential,^{22–24} including murine models of ccRCC.¹⁶

Hypoxia is a characteristic of solid tumors, and the adaptation of cancer cells to hypoxia is instrumental in the development of aggressive phenotype and associated with a poor prognostic in patients.²⁵ At the cellular level, the adaptation to hypoxia is predominantly mediated by the hypoxia-inducible factors (HIFs), consisting of an oxygen-sensitive α -subunit and a constitutively expressed β -subunit, that regulate the expression of target genes promoting angiogenesis, glycolysis, metastasis, increased tumor growth and resistance to treatments.²⁵ HIF-1 α and HIF-2 α are the best-characterized HIF- α subunits.²⁶ Although HIF-1 α is ubiquitously expressed, HIF-2 α has a more limited tissue expression and is particularly detected in highly vascularized organs or hypoxic tissues including kidney epithelial cells.²⁷ Despite their extensive sequence similarity and co-expression in various cancer cell types, HIF-1 α and HIF-2 α have non-overlapping roles in tumor progression.²⁸ The distinct roles of HIF-1 α and

¹CNRS, Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale, Toulouse, France; ²Université de Toulouse, UPS, IPBS, Toulouse, France; ³Equipe Labellisée Ligue contre le Cancer, Toulouse, France; ⁴Laboratoire d'Excellence Toulouse Cancer (TOUCAN), INSERM UMR-1037, Cancer Research Center of Toulouse (CRCT), Université de Toulouse, Toulouse, France; ⁵Lpath Inc, San Diego, CA, USA and ⁶Institut Universitaire du Cancer Toulouse Oncopôle, Toulouse, France. Correspondence: Dr IA Perarnau, STROMALab, UMR5273 CNRS UPS EFS INSERM U1031, Toulouse, France.

E-mail: isabelle.ader-perarnau@inserm.fr

or Dr O Cuvillier, CNRS UMR 5089, Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale, 205 Route de Narbonne, Toulouse 31077, France.

E-mail: olivier.cuvillier@inserm.fr

⁷These authors contributed equally to this work.

Received 15 September 2015; revised 21 December 2015; accepted 26 January 2016

HIF-2 α in promoting tumor growth have been mainly defined in von Hippel-Lindau (VHL) disease-associated clear cell renal cell carcinoma (ccRCC),²⁹ which results in a constitutive expression of either HIF-1 α and HIF-2 α or HIF-2 α alone, and where the role for HIF-2 α as a driver of a more aggressive disease has been firmly established.^{30,31}

We previously identified SphK1/S1P signaling as a new modulator of HIF-1 α activity under hypoxia owing to a decreased proteasome degradation of HIF-1 α subunit mediated by the Akt/GSK3 β pathway in various cancer cell models.³² More recently, we reported in a prostate cancer animal model that sphingomab, a monoclonal antibody neutralizing extracellular S1P, could reduce hypoxia and associated vascular network malfunction by interfering with HIF-1 activity thus enhancing delivery and efficacy of docetaxel, the standard chemotherapy.²⁴

Here, we report that the SphK1/S1P signaling pathway may act as a canonical regulator of HIF-2 α expression in multiple cancer cell lineages (lung, prostate and glioma) as well as in ccRCC cell lines (CAKI-1, A498 and 786-O) representing the sub-groups found in human clinic. Therefore, we suggest that targeting the SphK1/S1P signaling represents a strategy that could potentially be exploited in therapeutic approaches to decrease HIF-2 activity in cancer and more particularly in ccRCC. The humanized version of the anti-S1P mAb, sonopczumab, is currently in a phase II trial in RCC patients (www.clinicaltrials.gov).

RESULTS

SphK1 activity regulates HIF-2 α expression under hypoxia in multiple cancer cell lineages

To address whether SphK1 has a regulatory role in HIF-2 α expression under hypoxia, an siRNA strategy targeting SphK1 (siSphK1) was used. As previously reported,³² mRNA level and

SphK1 activity were markedly decreased (60–90% range) in all cancer cell lines (prostate PC-3, lung A549, glioblastoma U87, ccRCC CAKI-1 and A498) treated with siSphK1 compared with scrambled siRNA (siScr) (Figure 1a). In all cell lines, hypoxia was associated with a remarkable expression of HIF-2 α , which was significantly reduced by siSphK1 treatment (Figures 1b and f), suggesting that SphK1 regulates HIF-2 α in addition to HIF-1 α as previously published.^{32–34}

Considering the critical role of HIF-2 α in ccRCC,^{29,31} the molecular mechanisms of HIF-2 α regulation by SphK1 were further investigated in three ccRCC cell lines, representing the sub-groups found in human clinic (expressing either HIF-1 α and HIF-2 α or HIF-2 α alone). 786-O and A498 ccRCC cells lack a functional *VHL* gene and express only HIF-2 α , whereas CAKI-1 (pVHL wild-type) can produce both HIF-1 α and HIF-2 α . Noteworthy, in *VHL*-defective A498 where HIF-2 α is constitutively present under normoxia due to a lack of degradation, the silencing of SphK1 also repressed its expression (Figure 1f).

Involvement of Phospholipase D in regulating HIF-2 α SphK1-driven expression in ccRCC

Because phospholipase D (PLD) activity has been involved in the control of HIF-2 α expression in ccRCC³⁵ and is an upstream regulator of SphK1 in a different physiological context,³⁶ we next examined the interactions between PLD and SphK1 signaling with regard to HIF-2 α expression. In hypoxic CAKI-1, A498 cells (Figure 2a) and 786-O cells (Supplementary Figure 1A), an early transient increase in PLD activity (peaking at 15–30 min) followed by activation of SphK1 (peaking at 60 min) was observed. Accordingly, accumulation of HIF-2 α did not occur before 2–3 h of hypoxia in CAKI-1 cells (Figure 2a, *inset*). Confirming that SphK1 activation was a consequence of PLD stimulation, butan-1-ol (1-ButOH), a potent inhibitor of PLD activation, markedly inhibited

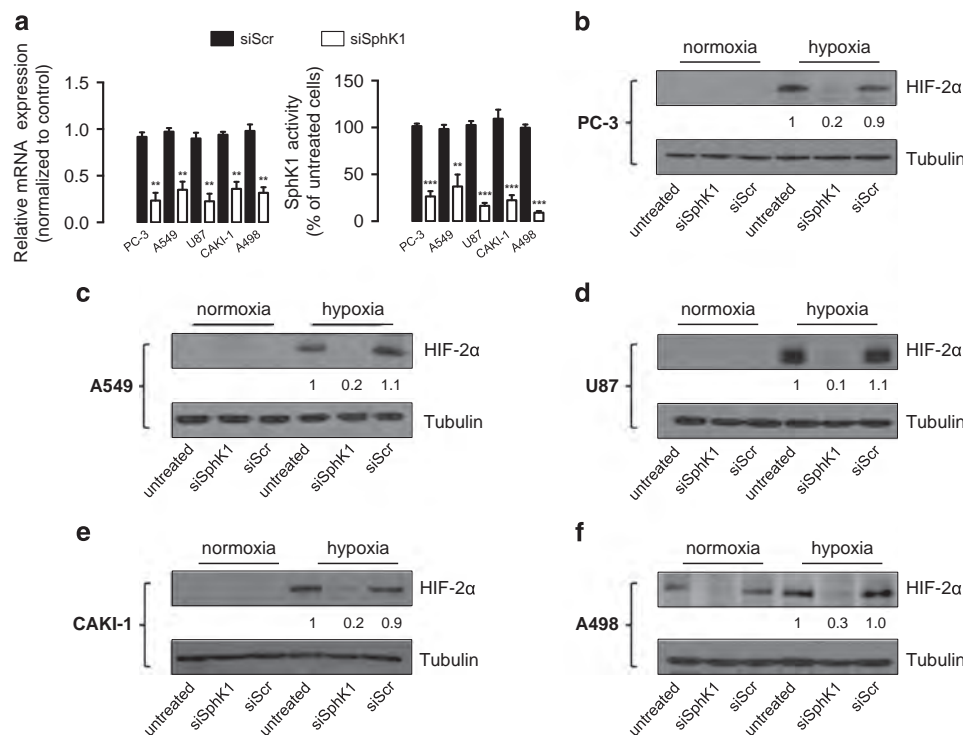


Figure 1. SphK1 silencing prevents HIF-2 α accumulation in multiple human cancer cell lines under hypoxia. (a), relative mRNA expression of SphK1 expression and SphK1 activity cells were measured in prostate (PC-3), lung (A549), brain (U87) and renal cancer (CAKI-1 and A498) cells after 72 h of treatment with 20 nmol/L of siSphK1 or siScr. Columns, mean of at least three independent experiments; bars, s.e.m. $^{**}P < 0.01$; $^{***}P < 0.001$. (b–f) PC-3 (b), A549 (c), U87 (d), CAKI-1 (e) and A498 (f) cells were untreated or treated with 20 nmol/L of siSphK1 or siScr then incubated under normoxia or hypoxia for an additional 6 h. HIF-2 α expression was analyzed by immunoblotting. Similar results were obtained in at least three independent experiments, and equal loading was monitored using antibody to tubulin.

SphK1 activity in all ccRCC cell lines (Figure 2b and Supplementary Figure 1B). To rule out any possible non-specific effect of the alcohols on SphK1 activity, cells were treated in the presence of

t-butanol (t-ButOH), a tertiary alcohol, which is not a substrate for PLD inhibition. As expected, t-ButOH did not alter SphK1 activity in ccRCC cell lines (Figure 2b and Supplementary Figure 1B).

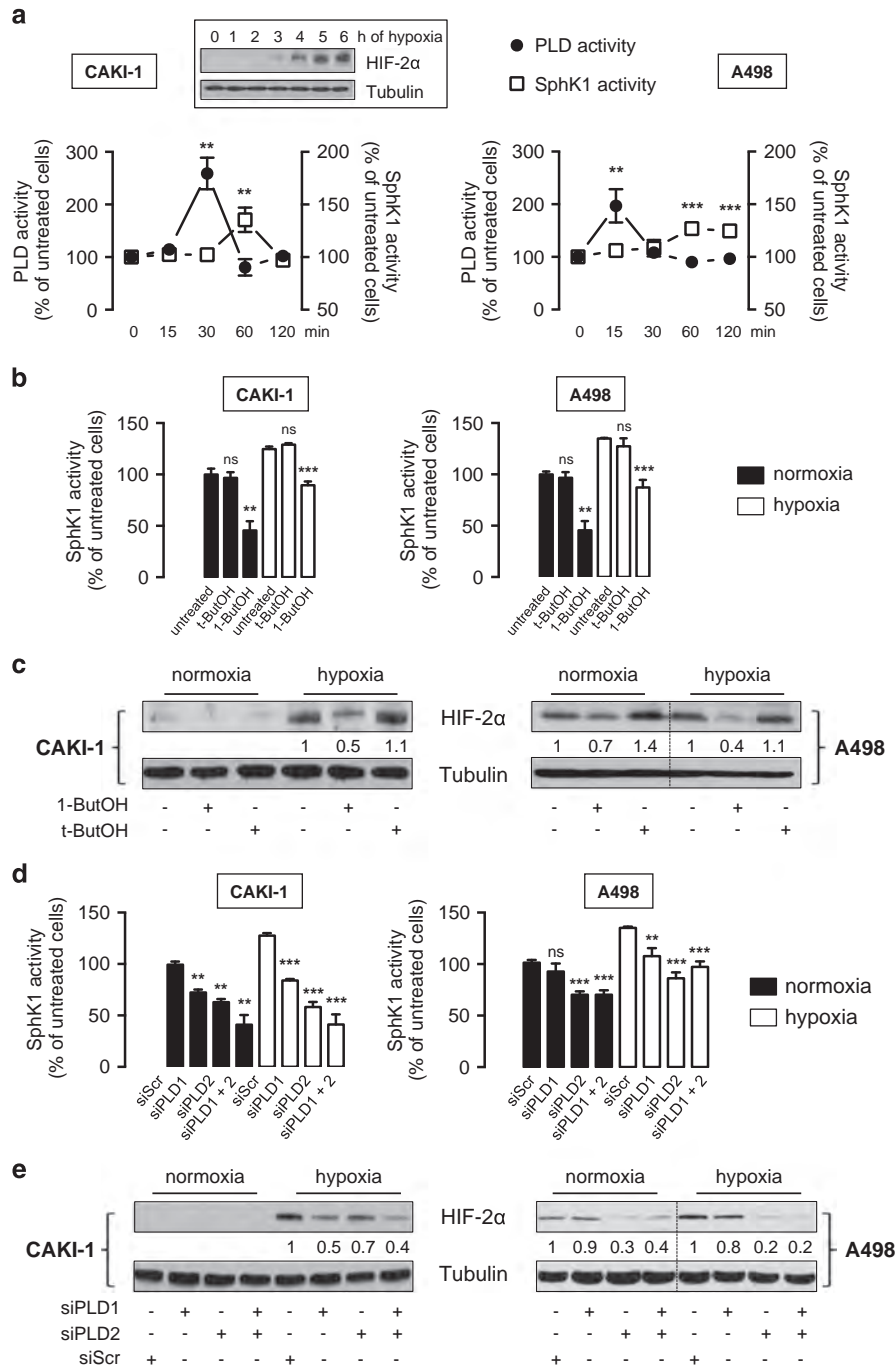


Figure 2. PLD regulates SphK1-dependent HIF-2α expression in CAKI-1 and A498 ccRCC cells. **(a)**, CAKI-1 (left) and A498 (right) cells were incubated under hypoxia for the indicated times and then tested for PLD and SphK1 enzymatic activities. Points, mean of at least three experiments; bars, s.e.m. $^{**}P < 0.01$; $^{***}P < 0.001$. Inset, HIF-2α expression in CAKI-1 cells exposed to hypoxia for the indicated times. Similar results were obtained in at least three independent experiments, and equal loading was monitored using antibody to α-tubulin. **(b, c)**, CAKI-1 (left) and A498 (right) cells were untreated or treated with 1-butanol (1-ButOH) or tert-butanol (t-ButOH) as control (0.8%). SphK1 activity **(b)** and HIF-2α expression **(c)** were determined in normoxia or after 1 h and 6 h of hypoxia, respectively. Similar results were obtained in at least three independent experiments, and equal loading was monitored using antibody to tubulin. Columns, mean of three independent experiments; bars, s.e.m. The two-tailed *P*-values between the means of normoxic or hypoxic cells are ns, not significant; $^{**}P < 0.01$; $^{***}P < 0.001$. **(d, e)** CAKI-1 (left) and A498 (right) cells were transfected with siPLD1 (50 nmol/L), siPLD2 (50 nmol/L) or siPLD1 (50 nmol/L) and siPLD2 (50 nmol/L) or siScr (50 nmol/L) for 72 h then incubated under normoxia or hypoxia. SphK1 activity **(d)** and HIF-2α expression **(e)** were determined after 1 h and 6 h of hypoxia, respectively. Similar results were obtained in at least three independent experiments, and equal loading was monitored using antibody to tubulin. Columns, mean of three independent experiments; bars, s.e.m. The two-tailed *P*-values between the means of normoxic or hypoxic cells are ns, not significant; $^{**}P < 0.01$; $^{***}P < 0.001$.

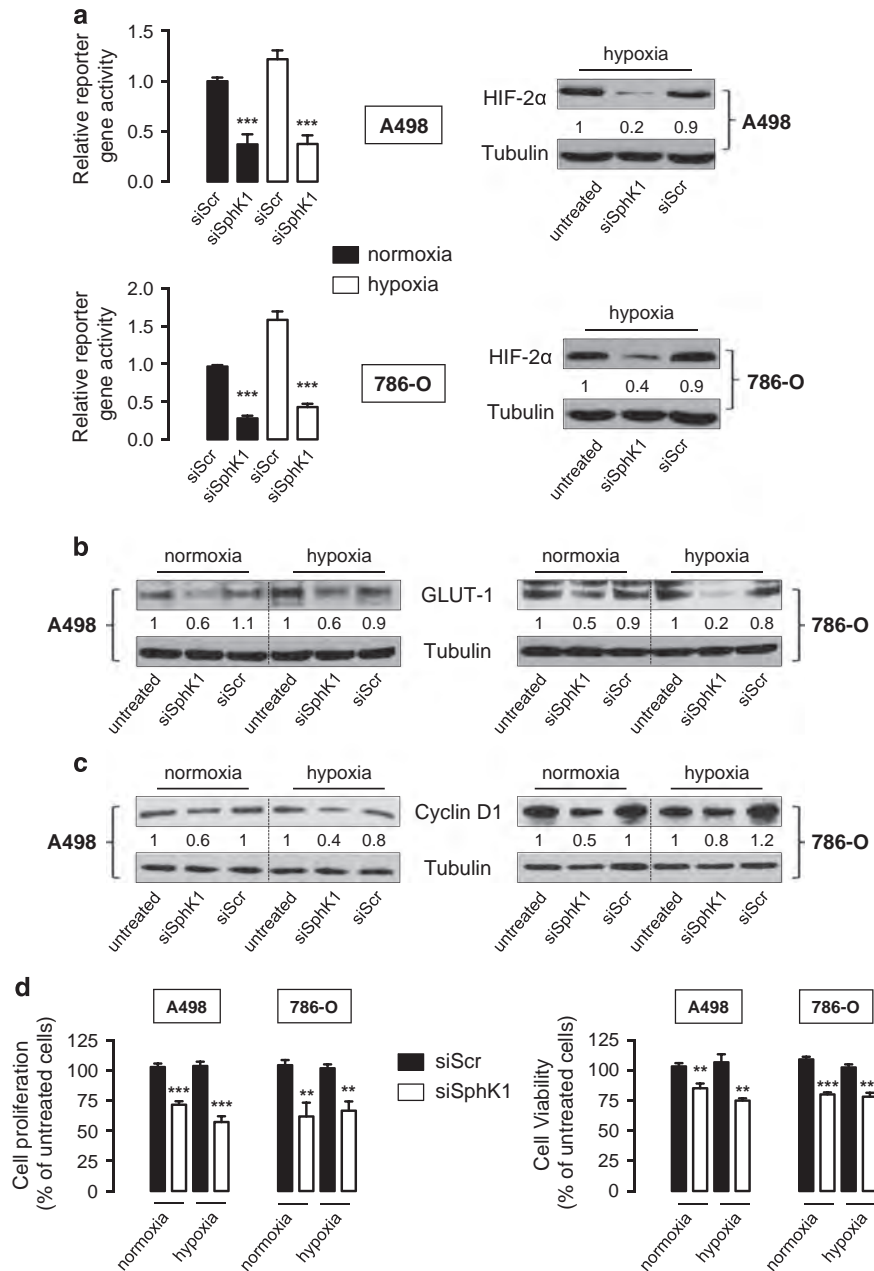


Figure 3. SphK1 silencing leads to a decrease in HIF-2 transcriptional activity in A498 and 786-O *VHL*-defective ccRCC cells. A498 and 786-O cells were treated with 20 nmol/l of siSphK1 or siScr for 72 h then incubated for an additional 16 h under normoxia or hypoxia. **(a)** HRE reporter gene assay (*left*) and protein HIF-2 α expression (*right*) in transiently transfected A498 (*upper*) and 786-O (*lower*) cells. The y axis shows normalized *Firefly* luciferase over *Renilla* luciferase activity relative to the wild-type normoxic response. HIF-2 α expression was analyzed by immunoblotting. Similar results were obtained in at least three independent experiments, and equal loading was monitored using antibody to tubulin. *Columns*, mean of at least four independent experiments; *bars*, s.e.m. *** P < 0.001. Cell lysates were assayed for GLUT-1 (**b**) and cyclin D1 (**c**) expression by western blot analysis. Similar results were obtained in three independent experiments, and equal loading was monitored using antibody to tubulin. **(d)** Cell proliferation and viability was respectively assessed using [3 H]-thymidine incorporation assay and MTT assay. *Columns*, mean of at least four independent experiments; *bars*, s.e.m. ** P < 0.01; *** P < 0.001.

Unlike t-ButOH, 1-ButOH markedly inhibited HIF-2 α expression in CAKI-1 cells (Figure 2c, *left*), as well as in normoxic and hypoxic A498 cells (Figure 2c, *right*) and in 786-O cells (Supplementary Figure 1c). To investigate which PLD isozyme could be involved in the PLD/SphK1/HIF-2 α signaling sequence, siRNAs directed to PLD1 and PLD2 isoforms were used.³⁷ A roughly 50% PLD knock-down in CAKI-1, A498 and in 786-O cells was achieved without additive effect when both siRNAs were combined (Supplementary Figure 2). Both PLD1 and PLD2 siRNAs significantly

reduced—although not to the same extent—SphK1 activity in CAKI-1 (Figure 2d, *left*), A498 (Figure 2d, *right*) and 786-O cells (Supplementary Figure 1D). Accordingly, the downregulation of SphK1 activity was accompanied by a marked reduction in HIF-2 α expression in hypoxic CAKI-1 cells (Figure 2e, *left*), as well as in normoxic and hypoxic A498 (Figure 2e, *right*) and 786-O cells (Supplementary Figure 1E). These data suggest that both PLD1 and PLD2 isozymes are likely required for regulation of HIF-2 α through SphK1 signaling in ccRCC cell lines.

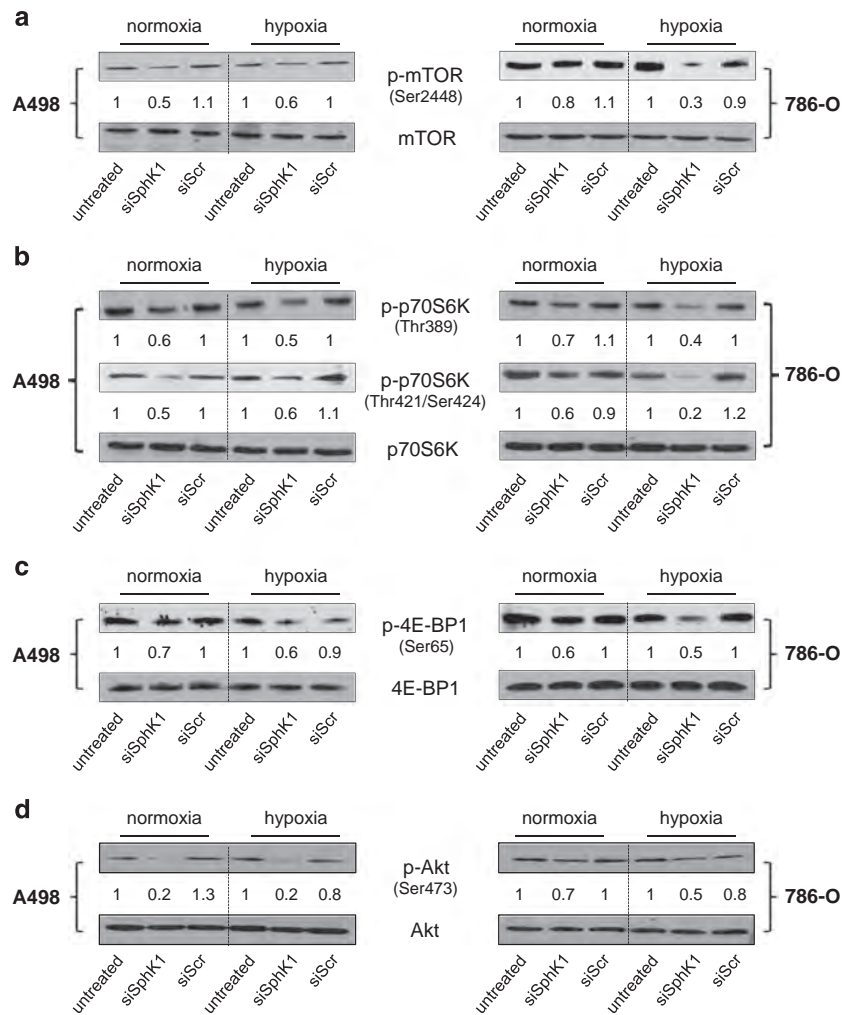


Figure 4. SphK1 silencing downregulates Akt/mTOR signaling pathway in *VHL*-defective A498 and 786-O ccRCC cells. A498 and 786-O cells were untransfected or transfected with 20 nmol/l of siSphK1 or siScr for 72 h before the experiments followed by 4 h under normoxic or hypoxic condition. Cell lysates were assayed for Ser2448 phosphorylated mTOR (p-mTOR Ser2448) and mTOR expression (**a**); Thr389 phosphorylated p70S6K (p-p70S6K Thr389), Thr421/Ser424 phosphorylated p70S6K (p-p70S6K Thr421/Ser424) and p70S6K expression (**b**); Ser65 phosphorylated 4E-BP1 (p-4E-BP1 Ser65) and 4E-BP1 expression (**c**); Ser473 phosphorylated Akt (P-Akt Ser473) and Akt expression (**d**) were analyzed by immunoblotting. Similar results were obtained in three independent experiments.

SphK1 silencing promotes a *VHL*-independent HIF-2α loss of activity and reduced cell proliferation in ccRCC

To establish whether SphK1 silencing was correlated with an inhibition of HIF-2 transcriptional activity, *VHL*-defective A498 and 786-O cells only known to express HIF-2α (vis-à-vis HIF-1α) under either normoxia and hypoxia^{38,39} were used to avoid the confounding role of HIF-1α we previously reported to be regulated by SphK1 activity.³² Accordingly in both *VHL*-defective A498 and 786-O cells, SphK1 silencing was associated with a decreased HIF-2α protein expression (Figure 3a, right). The role of HIF-2α transcriptional activity was further investigated by a transient-transfection assay with an HRE reporter gene (pHRE-Luc) for HIF-2α. Accordingly, HRE-mediated transcription was remarkably decreased in A498 and 786-O cells treated with siSphK1 (Figure 3a, left) in both normoxia and hypoxia. We next analyzed the level of GLUT-1 and cyclin D1, two well-established specific target proteins of HIF-2α in *VHL*-defective ccRCC.^{40,41} Under normoxia and hypoxia, SphK1 silencing significantly reduced levels of both glucose transporter GLUT-1 (Figure 3b) and cyclin D1 (Figure 3c) in both cell lines. Cyclin D1 is an important regulator of cell-cycle progression, and *in vitro* and *in vivo* data have demonstrated that HIF-2α-only-expressing ccRCC cells

proliferate faster than their HIF-2α and HIF-1α co-expressing counterparts.^{42,43} Therefore, we next assessed cell proliferation in SphK1-silenced *VHL*-defective ccRCC cells. [³H]Thymidine incorporation assay clearly showed that SphK1-silenced A498 and 786-O cells proliferated much slower than their siScr-silenced counterparts (Figure 3d, left) and showed a survival disadvantage (Figure 3d, right) in both normoxia and hypoxia in line with the findings that HIF-2α likely contributes to tumor cell survival.³⁹

SphK1 silencing is associated with impaired Akt, mTOR, p70S6K and 4E-BP1 phosphorylation in ccRCC

Akt/mTOR (mammalian target of rapamycin) signaling is often activated in cancer and was previously shown to impact HIF-2α expression.³⁵ To explore whether the loss of HIF-2α expression induced by SphK1 silencing was correlated with the inhibition of mTOR signaling, we examined the effect of siSphK1 on levels of total or phosphorylated forms of mTOR (p-mTOR) in A498 and 786-O cells. Under both normoxia and hypoxia, the levels of p-mTOR were clearly reduced after treatment with siSphK1 while total mTOR was not affected (Figure 4a). The regulation of cap-dependent translation initiation by mTOR involves direct phosphorylation of its substrates eukaryotic initiation factor 4E binding protein 1 (4E-BP1) and ribosomal protein kinase S6 (p70S6K).^{44,45}

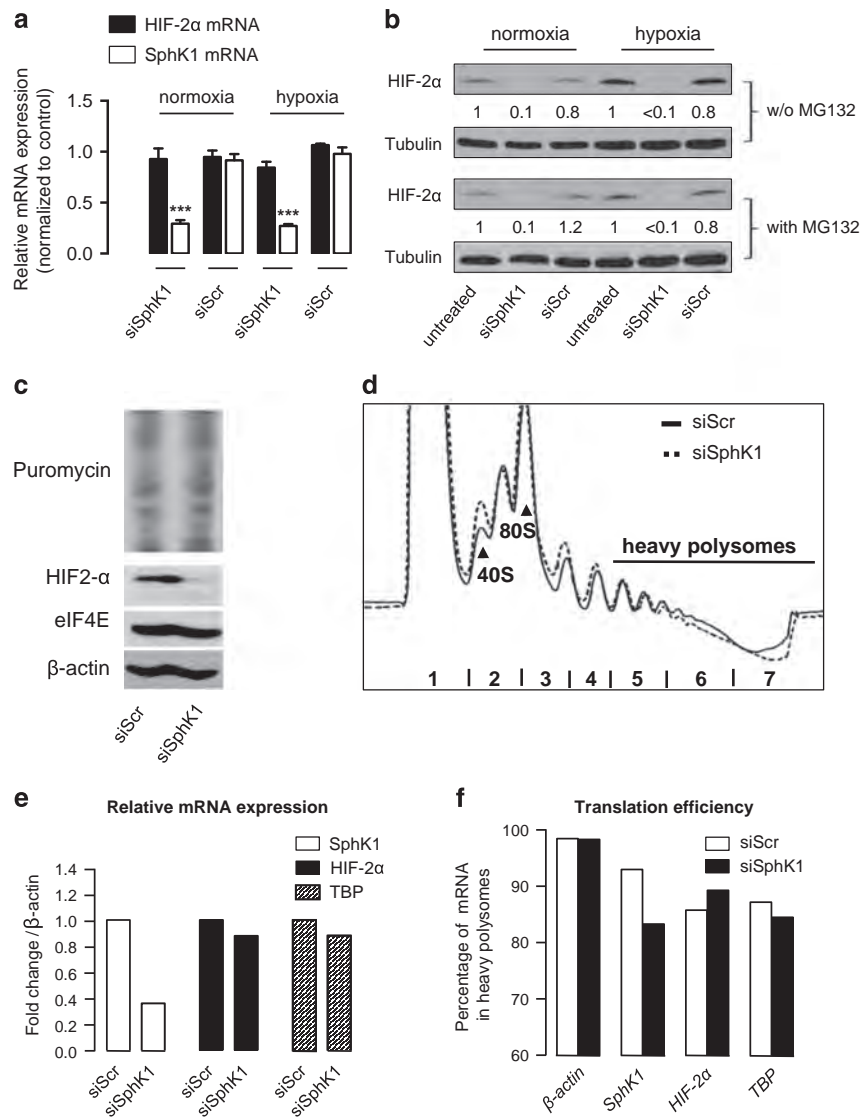


Figure 5. SphK1 signaling does not impact on protein synthesis and stability of HIF-2 α in A498 ccRCC cells. **(a)** Relative mRNA expression of HIF-2 α and SphK1 expression in A498 cells was measured after 72 h of treatment with 20 nmol/l of siSphK1 or siScr followed by 6 h under normoxic or hypoxic condition. Columns, mean of at least four independent experiments; bars, s.e.m. *** P < 0.001. **(b)** A498 cells were untransfected or transfected with 20 nmol/l of siSphK1 or siScr for 72 h before the experiments. Cells were then incubated for 6 h under normoxic or hypoxic condition in presence or absence of the proteasome inhibitor MG132 (10 μ M). Cell lysates were assayed for HIF-2 α expression by immunoblotting. Similar results were obtained in three independent experiments, and equal loading was monitored using antibody to tubulin. **(c)** A498 cells were transfected with siSphK1 or siScr as described in Figure 4. 48 h later, cells were treated for 10 min with 10 μ g/ml of puromycin, before cells collection. Whole-cell extracts were analyzed by western blot. Puromycin incorporation was measured as readout of protein synthesis using anti-puromycin antibody. **(d)** A498 cells were treated as in **(c)** and subjected to hypotonic lysis. Extracts were separated on 10–45% sucrose gradient and subjected to polysomal profile analysis. 40S ribosomal subunits, 80S ribosomes and heavy polysomes (actively translated mRNA) are indicated. **(e)** RT-qPCR experiments were performed for the indicated mRNAs on RNA extracted from samples in **(d)**. Results are presented as fold change normalized to β -actin mRNA and indicate relative mRNA expression. **(f)** RNA was extracted from light fractions (fractions 1–4) and heavy polysomes fractions (fractions 5–7) of the sucrose gradient from **(d)**. Relative abundance of the indicated mRNAs in heavy polysomes was quantified by RT-qPCR and presented as translation efficiency for each mRNA. TATA binding protein and β -actin mRNAs were used as controls.

Activated p70S6K phosphorylates the 40S ribosomal protein S6 whereas phosphorylation of 4E-BP1 disrupts its inhibitory interaction with eukaryotic initiation factor 4E (eIF-4E). SphK1 silencing slightly decreased phosphorylation of p70S6K (Figure 4b) and 4E-BP1 (Figure 4c) in both A498 and 786-O cells.

By activating the tuberous sclerosis complex TSC1/TSC2 leading the activation of mTOR, Akt may represent a mechanistic link between S1P signaling and mTOR signaling as S1P regulates Akt phosphorylation as a ligand for five high-affinity G-coupled receptors (S1P₁₋₅)⁴⁶ in various physiological conditions.³ SphK1

silencing in both A498 and 786-O cells was accompanied by a significant reduction in Akt phosphorylation (Figure 4d).

Collectively, these findings suggest that SphK1 silencing reduces the canonical Akt/mTOR pathway.

SphK1 inhibition does not impact on protein synthesis and stability of HIF-2 α in ccRCC

SphK1 signaling could regulate HIF-2 α expression and activity at the levels of transcription, translation or protein stability. SphK1 silencing did not alter the mRNA level of HIF-2 α in both normoxia

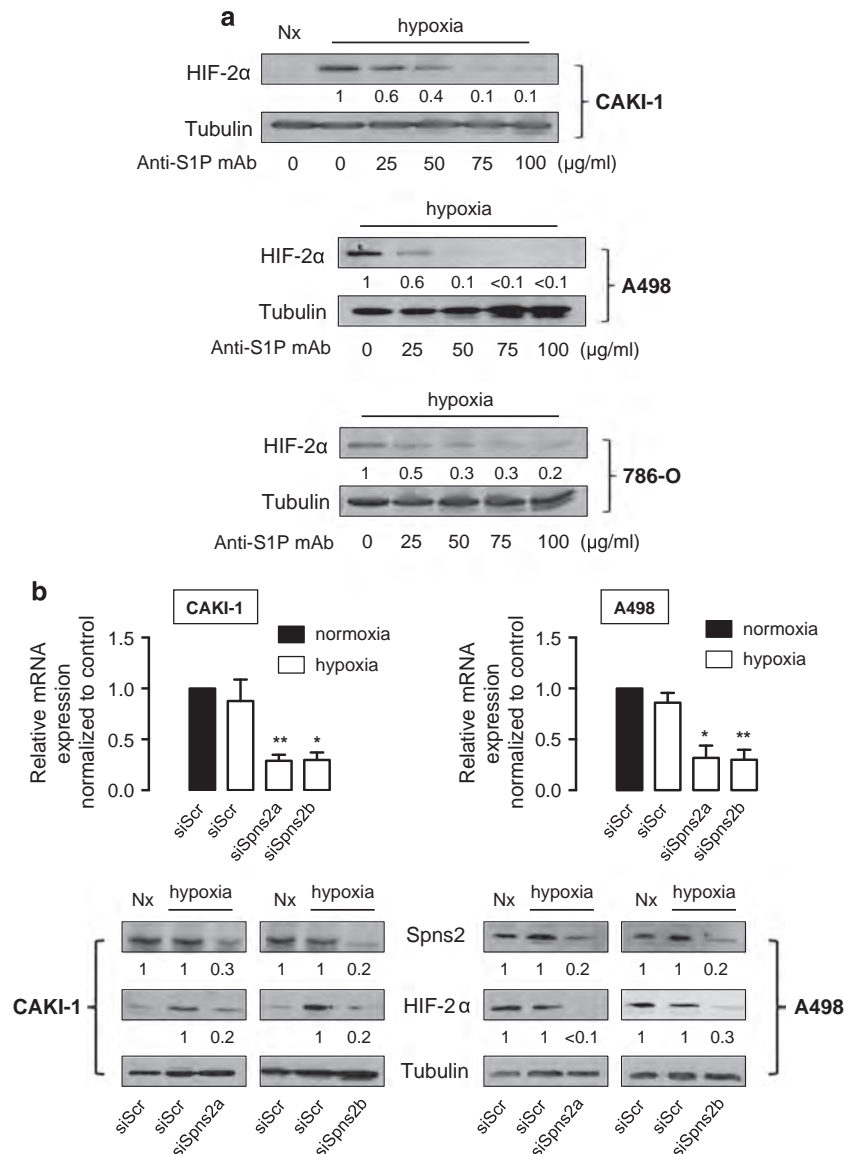


Figure 6. Exogenous S1P regulates HIF-2 α accumulation in CAKI-1, A498 and 786-O ccRCC cells. **(a)** CAKI-1, A498 and 786-O cells were treated with the indicated concentrations of anti-S1P mAb for 2 h, then incubated under normoxia or hypoxia for an additional 6 h and HIF-2 α expression was analyzed by immunoblotting. **(b)** Relative mRNA expression of Spns2 expression in CAKI-1 and A498 cells was measured after 72 h of treatment with 90 nmol/l of two different siSpns2 (siSpns2a and siSpns2b) or siScr followed by 6 h under normoxic or hypoxic condition. Columns, mean of at least four independent experiments; bars, s.e.m. * P < 0.05; ** P < 0.01. **(c)** CAKI-1 and A498 cells were transfected with 90 nmol/l of two different siSpns2 (siSpns2a and siSpns2b) or siScr for 72 h, then incubated under normoxia or hypoxia for an additional 6 h. Cell lysates were assayed for Spns2 and HIF-2 α expression by immunoblotting. For all experiments, similar results were obtained in at least three independent experiments, and equal loading was monitored using antibody to tubulin.

and hypoxia in both A498 (Figure 5a) and 786-O (Supplementary Figure 3A) *VHL*-defective ccRCC cells. We next used the proteasome inhibitor MG132 to determine whether the regulatory process mediated by SphK1 was related to proteasome-dependent degradation of HIF-2 α . MG132 treatment did not reverse the HIF-2 α decrease observed in SphK1-silenced *VHL*-defective ccRCC A498 (Figure 5b) and 786-O cells (Supplementary Figure 3B). Similar findings were observed in *VHL*-positive CAKI-1 ccRCC and A549 lung cancer (Supplementary Figure 3C), suggesting that SphK1 activity regulates HIF-2 α content regardless of the presence or absence of *VHL*.

Following our observation that SphK1 silencing induces a reduced phosphorylation of p70S6K and 4E-BP1 (Figures 4b and c), we analyzed the impact of SphK1 reduction on protein synthesis and accessed the translational regulation of HIF-2 α

mRNA. Silencing of SphK1 in A498 has no impact on total protein synthesis (Figure 5c) or polysomes formation (Figure 5d), suggesting that the decreased HIF-2 α protein abundance is not associated with a global protein synthesis shutdown under normoxic condition. We then measured the translation efficiency of HIF-2 α mRNA upon SphK1 silencing. We first confirmed that HIF-2 α mRNA abundance remained unchanged on samples used for polysomes fractionation (Figure 5e). We then measured relative abundance of HIF-2 α and SphK1 mRNAs in polysomal fractions. TBP and β -actin mRNAs were used as controls. The data indicate that HIF-2 α , TBP and β -actin mRNAs relative distribution along polysome fractions remains unchanged upon SphK1 silencing (Supplementary Figure 4) and consequently show no variation of translation efficiency (Figure 5f). In contrast upon siSphK1 transfection, SphK1 mRNA was strongly decreased (70%) at the transcriptional level

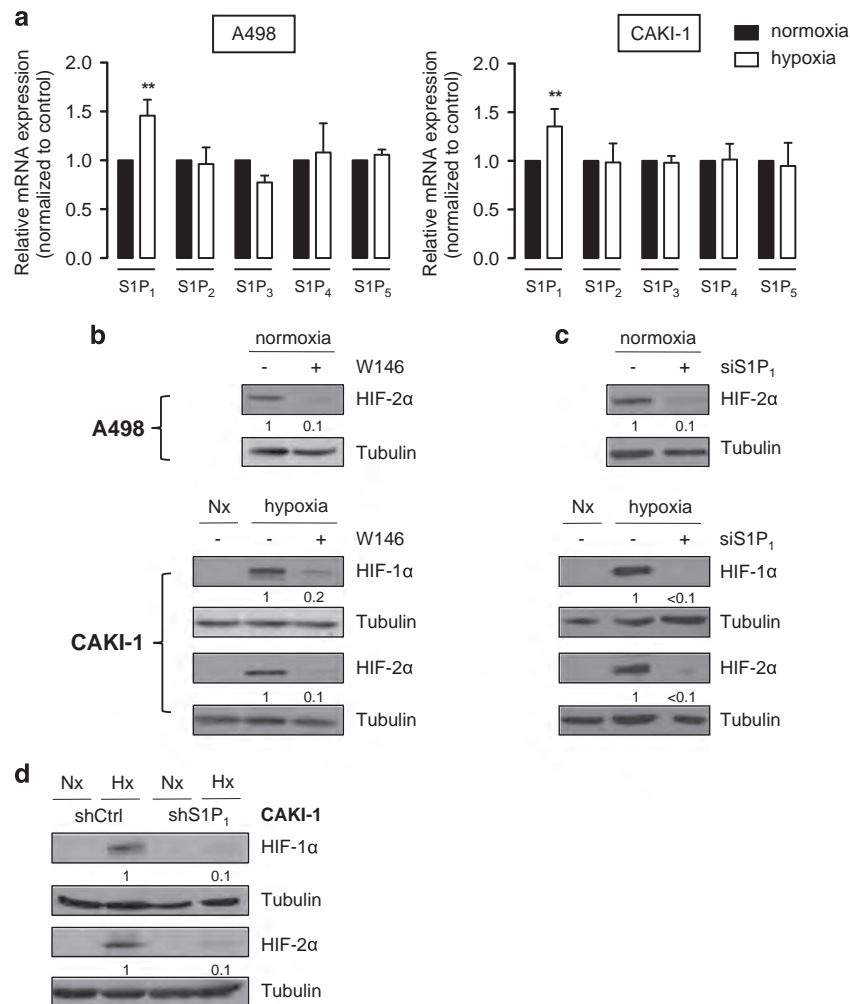


Figure 7. S1P₁ mediates the effect of S1P on HIF-1 α and HIF-2 α protein content in CAKI-1 and A498 ccRCC cells. **(a)** The relative mRNA expression of S1P₁₋₅ in A498 and CAKI-1 was measured after 1 h of incubation under normoxic (black) or hypoxic (white) conditions. Columns, mean of at least five independent experiments; bars, s.e.m. ****** $P < 0.01$. **(b)** A498 and CAKI-1 cells were treated with W146 (5 μ M) or ethanol (control), then incubated under normoxia (Nx) or hypoxia for 6 h. HIF-1 α and HIF-2 α expression was analyzed by immunoblotting. **(c)** A498 and CAKI-1 cells were transfected with 50 nmol/l of siS1P₁ or siScr for 72 h, then incubated under normoxia (Nx) or hypoxia for an additional 6 h. Cell lysates were assayed for HIF-1 α and HIF-2 α expression by immunoblotting. **(d)** CAKI-1 shS1P₁ and CAKI-1 shCtrl cell lines were incubated under normoxia (Nx) or hypoxia (Hx) for 6 h, and HIF-1 α and HIF-2 α expression was analyzed by immunoblotting. For all experiments, similar results were obtained in at least three independent experiments, and equal loading was monitored using antibody to tubulin.

and was much less translated (10%) as a consequence of a reduced abundance over other mRNAs.

These data indicate that the reduction of HIF-2 α protein levels by SphK1 downregulation is not to be due to a translation of HIF-2 α mRNA or an enhanced degradation of HIF-2 α protein. The slight reduction of 4E-BP1 and p70S6K phosphorylation downstream mTOR observed upon SphK1 silencing was not sufficient to induce a decrease in global protein synthesis, suggesting that other mechanisms might be involved.

Neutralization of exogenous S1P decreases HIF-2 α content in ccRCC

Owing to the fact that recent studies suggest that exogenous S1P could regulate adaptation to hypoxia through the content of HIF-1 α in cancer^{24,34} and non-cancer cells,⁴⁷ we examined the contribution of extracellular S1P in the regulation of HIF-2 α in our ccRCC cell models. We took advantage of the monoclonal antibody sphingomab that binds to and neutralizes extracellular S1P,^{21-24,48} which is currently in Phase II clinical trial for metastatic ccRCC. As seen in Figure 6a, sphingomab inhibited HIF-2 α protein expression in a concentration-dependent manner in CAKI-1, A498

and 786-O cell lines. This finding is consistent with many reports showing that S1P is produced intracellularly by SphK1 and exerts its paracrine/autocrine effects by being secreted into the tumor microenvironment.⁴⁸ Spinster 2 (Spns2) is believed to be the primary transporter in the release of S1P.⁶ Thus, when CAKI-1 and A498 cells were treated with Spns2-specific siRNAs, the expression of Spns2 protein decreased to less than 20–30% of the control with two different siRNAs (Figure 6b). In line with our recent data suggesting an autocrine effect of S1P in regulating HIF-1 α in hypoxic prostate cancer cells,²⁴ the silencing of Spns2 was associated with a significant inhibitory effect on HIF-2 α accumulation under hypoxia in both CAKI-1 and A498 cells (Figure 6b).

These data establish the exclusive contribution of exogenous S1P mediating the effect of SphK1-driven signaling to regulate HIF-2 α content in ccRCC cell lines.

S1P₁ is upregulated under hypoxia and mediates the effect of S1P on HIF-2 α

Exogenous S1P is a ligand for five high-affinity G protein-coupled receptors (S1P₁₋₅), with specific effects depending on the suite of S1P receptor subtypes expressed.⁵ Representative CAKI-1 and

A498 ccRCC cells express all S1P receptors, we evaluated their involvement in both HIF-1 α and HIF-2 α regulation. We show that S1P₁ mRNA is increased after 60 min of hypoxia, while S1P₂₋₅ mRNA expression is unchanged (Figure 7a). To investigate the contribution of S1P₁ in the regulation of HIF-1 α and HIF-2 α in our models, the targeting of S1P₁ was achieved with the specific antagonist W146. HIF-2 α expression was markedly reduced in both A498 and CAKI-1 cells (Figure 7b). Similarly, the downregulation of S1P₁ by siRNA strategy in A498 and CAKI-1 cells or shRNA in CAKI-1 cells (Supplementary Figure 5) was accompanied by a strong decrease in HIF-2 α expression (Figures 7c and d). We also observed a significant reduction in HIF-1 α accumulation under hypoxia in CAKI-1 cells that can produce both HIF-1 α and HIF-2 α (Figures 7b and c). Similar findings were found in prostate PC-3 and glioblastoma U87 cells (Supplementary Figure 6), suggesting a potential exclusive contribution of S1P₁ receptor subtype in mediating the effect of S1P on both HIF-1 α and HIF-2 α content in cancer cells.

DISCUSSION

HIF-2 α is frequently overexpressed in solid tumors,⁴⁹ but its role has been mostly studied in ccRCC, the most common form of kidney cancer, where it has emerged as a key driver in the development and progression of the disease.⁵⁰ A majority of ccRCC (50–80%) exhibit a genetic inactivation of *VHL* gene resulting in the loss of pVHL, which normally mediates ubiquitination of HIF-2 α and its subsequent degradation, leading to a constitutive accumulation of HIF-2 α .⁵¹ HIF-2 α is both necessary and sufficient to support tumor growth of ccRCC,^{52,53} whereas the activity of HIF-1 α has been shown to be dispensable as its expression is often silenced.^{54–56} In particular, tumor-promoting genes encoding cyclin D1, TGF α and VEGF have been shown to be driven specifically by HIF-2 α ,⁴¹ and HIF-2 α -only-expressing ccRCC appears to exhibit a more aggressive clinical behavior.³¹

The relationship between S1P metabolism and HIF signaling has recently emerged in cancer cells from different origins (prostate, thyroid, glioma, lung, kidney and breast) with the majority of studies^{32–34} establishing that the SphK1/S1P signaling controls the regulation of HIF-1 α under hypoxic conditions reviewed in Ader *et al.*⁵⁷ and Cuvillier *et al.*,⁵⁸ whereas an upstream effect of HIF-1 α on SphK1/S1P signaling was proposed using a CoCl₂ chemically-induced model of hypoxia in U87 glioma cells.⁵⁹ With respect to HIF-2 α , earlier studies have suggested that HIF-2 α transcriptionally upregulates SphK1 expression in CoCl₂-induced HIF-2 α activation in glioma-derived U87 cells.⁵⁹ Although this manuscript was in preparation, Salama *et al.*⁶⁰ reported that HIF-2 α was also acting upstream of SphK1/S1P signaling in 786-O ccRCC. As shown in Supplementary Figure 7, we did not find any effect of HIF-2 α on SphK1 expression in ccRCC models exhibiting different VHL status (CAKI-1 and A498). In contrast, we show here for the first time that the SphK1/S1P signaling regulates HIF-2 α content and activity not only in ccRCC but also in other tumor types (lung, prostate, glioma), suggesting a possible universal regulatory role in cancer cells.

Considering the critical role of HIF-2 α in ccRCC pathogenesis, we further detailed the molecular mechanisms of HIF-2 α regulation by the SphK1/S1P signaling in various ccRCC models representing the sub-groups found in human clinic,²⁹ and by taking advantage of the features of A498 and 786-O *VHL*-defective cells that only express HIF-2 α ,^{38,39} and not HIF-1 α we previously reported to be regulated by SphK1 signaling.³²

As previously published for HIF-1 α ,³² a significant rise in SphK1 activity (peaking at 60 min) before HIF-2 α accumulation (2–3 h) was observed under hypoxia. PLD activity (peaking at 15–30 min) is known to regulate HIF-2 α accumulation in ccRCC,⁶¹ but a novel finding is that SphK1 is a downstream target of PLD under hypoxia as described earlier in different physiological settings.^{36,62}

Using A498 and 786-O *VHL*-defective cells that only express HIF-2 α , we demonstrate that SphK1 activity controls not only HIF-2 α protein content but also its transcriptional activity, as downregulation of specific HIF-2-regulated genes such as GLUT-1 or cyclin D1 was observed in SphK1-silenced cells. Accordingly, the proliferation rate and the cell viability were significantly inhibited in SphK1-silenced A498 and 786-O cells, demonstrating that SphK1 activity promotes a survival advantage in accord with the notion that HIF-2 α contributes to tumor cell survival.³⁹

Importantly, we discovered that SphK1 signaling does not regulate HIF-2 α protein content in ccRCC and non-ccRCC cells by a proteasome-dependent mechanism, suggesting a general mode of action regardless of the origin of the cell lines used and the presence or not of pVHL. Rather, SphK1 activity regulates the canonical mTOR pathway, which is often dysregulated in cancer and has a crucial role in the control of HIF-2 α translation.⁶¹

Although, we observed a small decrease in 4E-BP1 and p70S6K phosphorylation, this was not sufficient to induce a marked decrease in global protein synthesis or poly-ribosomes assembly, neither to specifically reduce HIF-2 α mRNA translation. Recent studies establish that autophagy might be accountable for HIF-2 α protein downregulation in renal cancer.⁶³ Sphingolipid-mediated regulation of autophagy exists but the contribution of S1P signaling remains enigmatic and not yet studied in the hypoxia context (reviewed in Li *et al.*⁶⁴). On the basis of our data, we may suspect that SphK1-dependent downregulation of Akt/mTOR pathway might impact the autophagy process leading to the reduction of HIF-2 α protein abundance.

We also show that Akt represents a mechanistic link between SphK1/S1P signaling and mTOR signaling, as SphK1 silencing abrogates the Akt/mTOR stimulation. Because Akt signaling can be activated by all Gi-coupled S1P receptor subtypes,^{5,65} and because S1P has been shown to be released from hypoxic cells,^{24,59,66} we explored the effects of the neutralization of extracellular S1P with anti-S1P monoclonal antibody sphingomab.¹³ Similar to our recent data showing that sphingomab could block HIF-1 α accumulation and activity in prostate cancer cell and animal models,²⁴ our findings firmly establish the contribution of extracellular S1P in the regulation of HIF-2 α as the silencing of S1P exporter Spns2 as well as the use of sphingomab markedly reduced HIF-2 α in all ccRCC subtypes. These data are consistent with our recent report that SphK1 is upregulated in mice xenografts after resistance to VEGFR2 tyrosine kinase inhibition.¹⁶ Moreover, sphingomab retarded the growth of A498 and 786-O xenografts, particularly after resistance to tyrosine kinase inhibition was established.¹⁶ In the current work establishing the HIF-2/S1P/hypoxia axis, we also established that S1P₁ mRNA is upregulated under hypoxia and required for both HIF-1 α and HIF-2 α accumulation in several human tumor cell lines, while S1P₃ has previously been shown to be involved in the regulation of HIF-1 α in a thyroid cancer model.³⁴

In summary, the present report demonstrates that the SphK1/S1P signaling pathway is a potent regulator of HIF-2 in human cancer notably in ccRCC, the most common form of kidney cancer. This disease is aggressive, notoriously resistant to conventional chemotherapy, and is almost invariably an incurable condition.⁶⁷ SphK1/S1P inhibition might represent an alternative therapeutic strategy to current mTOR- or VEGF-targeted agents, as S1P is widely appreciated as a general growth-like factor and a potent protector against apoptosis in addition to its specific regulatory role on HIF-2. The targeting S1P metabolism is ongoing with a humanized version of that anti-S1P mAb, which is being investigated as a treatment for metastatic ccRCC in patients that have failed up to three targeted therapies (www.lpath.com). Anti-S1P strategies could not only provide a beneficial therapeutic option in ccRCC, but also in other cancers as the role of HIF-2 as an oncoprotein might extend beyond renal carcinomas.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals and reagents

Culture medium and antibiotics were from Lonza (Basel, Switzerland). Serum was from Perbio (Brebieres, France). MG132 was obtained from Merck Millipore (Saint-Quentin en Yvelines, France). W146 was from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA). The murine monoclonal anti-S1P antibody, sphingomab, was as described previously.²¹ [γ -³²P] ATP and [9,10-³H(N)]-palmitic acid were from Perkin (Courtaboeuf, France). TLC plates were from VWR (Fontenay sous Bois, France). All other reagents were from Sigma (Saint-Quentin Fallavier, France).

Cell culture

Human prostate PC-3 and lung A549 cell lines were obtained from DSMZ (Braunschweig, Germany). Human U87 glioblastoma and ccRCC CAKI-1 cells were from ATCC (Molshiem, France). Human ccRCC A498 and 786-O were kindly supplied by Dr G Melillo (NCI, Frederick, MD, USA). CAKI-1 shS1P₁ and CAKI-1 shCtrl have been established by the Plateau de Vectorologie de Rangueil (CRCT, Toulouse, France) using a pLKO.1-puro-CMV-tGFP plasmid containing a 'Non Target Control' sequence for shCtrl or a GCTGCTCAAGACCGTAATTAT sequence for shS1P₁ (clone ID: TRCN0000011360; Sigma). Cells were cultured in RPMI containing 10% FBS at 37 °C in 5% CO₂ humidified incubators. Cell lines were routinely verified by the following tests: morphology examination, growth analysis and mycoplasma detection (MycAlert; Lonza). All experiments were started with low-passaged cells (< 15 times). Hypoxia (0.1% O₂, 5% CO₂, 94.5% N₂) was achieved using an *In Vivo*2 hypoxic workstation (Ruskin, Bridgend, UK).

RNA interference experiments

Transient interference was achieved by double-stranded human siRNAs 5'-GGGCAAGGCCUUGCAGCUCdT-3' (siSphK1) as previously reported;^{32,68} 5'-AAGGAAACCUAGUACUGAGC-3' (siPLD1) and 5'-AAUGGGGAGGUUACUUUGCU-3' (siPLD2);³⁷ 5'-GGUGUGUUAUUCUCAU-3'; 5'-GCUAUUACUACAAUGCUGAA-3'; 5'-GAAGCGCUCUUACUUGGU-3' (siS1P₁, pool);⁵⁹ and MISSION predesigned siRNAs from Sigma for human Spns2: Spns2 siRNAa: 5'-CGCUAUGCUCUGCCUUdTdT-3'; and Spns2 siRNAb: 5'-CACUCAUCUCAUUCUGGdTdT-3'.²⁴ Aleatory sequence siScr was from Eurogentec (Angers, France). Transfections were carried out using Lipofectamine 2000 in OPTI-MEM medium according to the manufacturer's instructions (Invitrogen, Villebon-sur-Yvette, France).

SphK1 and PLD enzymatic assays

The protocol for the determination of SphK1 enzymatic activity has been described in details previously.⁶⁹ PLD activity was determined as reported by Brizuela *et al.*³⁶ with slight modifications. Cells were treated with the primary alcohol, 1-butanol (0.3%), instead of ethanol (1%). The TLC plates were developed in this case with the superior phase from a mixture of ethylacetate/isooctan/acetic acid/water (55/25/10/50).

Reporter gene assay

For luciferase assays, cells were plated in 24-well plates and transfected, using Lipofectamine (Invitrogen), with 150 ng of the reporter vector (pRE-tk-LUC) containing three copies of the HRE from the erythropoietin gene and 50 ng of Renilla luciferase plasmid DNA, as an internal control. Twenty-four hours after transfection, cells were incubated under normoxic (20% O₂) or hypoxic conditions (0.1% O₂) for 16 h. Cells were then lysed and luciferase activities were measured using the Dual Luciferase Assay Kit (Promega, Charbonnières-les-Bains, France) following the manufacturer's recommendations. Results were quantified with a MicroBeta TRILUX luminescence counter (Perkin Elmer, Villebon-sur-Yvette, France), and normalized values were expressed as the fold induction over control cells.

Western-blot analysis and antibodies

Rabbit anti-HIF-2α (Novus, Littleton, CO, USA), mouse anti-HIF-1α (BD, San Jose, CA, USA), rabbit anti-GLUT-1 (ThermoScientific, Villebon-sur-Yvette, France), mouse anti-cyclin D1, rabbit anti-p70S6K, rabbit anti-phospho-p70S6K (Thr389), rabbit anti-phospho-p70S6K (Thr421/Ser424), rabbit anti-mTOR, rabbit anti-phospho-mTOR (Ser2448), rabbit anti-4E-BP1, rabbit anti-phospho 4E-BP1 (Ser65), rabbit anti-Akt, rabbit anti-phospho-Akt (Ser473) (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), rabbit anti-Spns2 (Sigma), anti-tubulin (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), mouse anti-puromycin (Millipore, 12D10) were used as primary antibodies. Proteins

were visualized by an ECL detection system (Perbio, Villebon-sur-Yvette, France) using anti-rabbit or anti-mouse horseradish peroxidase-conjugated IgG (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). Densitometry quantitation was determined using the Image J software (NIH, Bethesda, MD, USA).

Quantitative real-time PCR

Total RNA was isolated using the RNeasy minikit (Qiagen, Courtaboeuf, France), and 1 µg was reversed transcribed to cDNA using the SuperScript First Stand Synthesis System (Invitrogen). Quantitative real-time PCR was performed using the MESA Blue PCR Master mix (Eurogentec). Reactions were performed using hSphK1-specific primers (forward 5'-CTGGCAGCTTCCTTGAACCAT-3'; reverse, 5'-TGTGCAGAGACAGCAGGTTCA-3'), hHIF-2α-specific primers (forward, 5'-TCCCACCACTTCACTCTCT-3'; reverse, 5'-TCA GAAAAAGGCCACTGCTT-3'), hS1P₁-specific primers (forward, 5'-AAATTC CACCGACCATGTA-3'; reverse, 5'-AGTTATTGCTCCCGTTGTGG-3'), hS1P₂-specific primers (forward, 5'-CACCTGGCGGTACAAAGAAT-3'; reverse, 5'-GTCAAGTGGCAGCTGATGAA-3'), hS1P₃-specific primers (forward, 5'-GCT TCAGGAAATGGAAGCTG-3'; reverse, 5'-TCAGGATGCTGTGAACTGC-3'), hS1P₄-specific primers (forward, 5'-CTGCTCTTACCAGCCCTGGC-3'; reverse, 5'-GAAGCCGTAGACGCGGCTGG-3'), hS1P₅-specific primers (forward, 5'-GTGAGGTGGGAGCCATAGAA-3'; reverse, 5'-TTGGCTGAGTCTCCAGAGT-3') and actin-specific primers (forward, 5'-ATTGGCAATGAGCGGTTCC-3'; reverse, 5'-GGTAGTTCTGTGGATGCCACA-3'). β-Actin-specific primers (forward primer, 5'-GCAAAGACCTGTACGCCAAC-3'; reverse primer, 5'-AGT ACTTGCGCTCAGGAGGA-3'), TBP-specific primers (forward primer, 5'-TGA CCTAAAGACCATTTGCATTTCG-3'; reverse primer, 5'-CGTGGTTCGTGGCT CTCTTATC-3'). For analysis, all genes were normalized to expression of zeta polypeptide (YWHAZ) gene as an endogenous control. For experiment on translational regulation of HIF-2α mRNA, β-actin and TBP mRNA were used as an endogenous control.

Sunset assay

The SUNSET assay was used to monitor the rate of protein synthesis as described.⁷⁰ Briefly, 10 min before harvesting the cells, puromycin was added to culture medium at 1 µg/ml. Cell extracts were then processed for western blotting using anti-puromycin antibody.

Polysome analysis, RNA isolation, microarray and associated RT-qPCR

Cells were washed twice with cold PBS containing 100 µg/ml cycloheximide, collected and lysed in a hypotonic lysis buffer (5 mM Tris-HCl (pH 7.5), 2.5 mM MgCl₂, 1.5 mM KCl, 100 µg/ml cycloheximide, 2 mM DTT, 0.5% Triton X-100 and 0.5% sodium deoxycholate). Lysates were loaded onto 10–45% sucrose density gradients (20 mM HEPES-KOH (pH 7.6), 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂) and centrifuged at 45 000 r.p.m. (SW 55 Ti rotor; Beckman Coulter, Villepinte, France) for 45 min at 4 °C. Gradients were fractionated, and the optical density at 254 nm was continuously recorded using an ISCO fractionator (Teledyne ISCO; Lincoln, NE, USA).

Polysome fractions were pooled by two polysome-associated mRNAs, and RNA was isolated using TRIzol-LS (Thermo Fisher, Villebon-sur-Yvette, France). A parallel sample was collected from the postnuclear lysates that were loaded onto the sucrose gradient cytoplasmic mRNA, and RNA was isolated using TRIzol (Thermo Fisher). RT-qPCRs were carried out using RevertAid H Minus Reverse Transcriptase (Thermo Fisher) and SsoFast EvaGreen Supermix (Bio-Rad) according to the manufacturers' instructions.

Statistical analysis

The statistical significance of differences between the means of two groups was evaluated by unpaired Student's *t*-test. All statistical tests were two-sided, and the level of significance was set at *P* < 0.05. Calculations were done using Prism 7 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

CONFLICT OF INTEREST

Authors would like to disclose that Dr Sabbadini is a founder of Lpath, and has stock in the company and is an inventor.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Ligue Nationale Contre le Cancer (Equipe Labellisée LIGUE to OC, Equipe Labellisée

LIGUE to SP and Allocation de thèse to PB and DM), Fondation de France (to OC), the Labex TOUCAN (to SP), the Comité 31 of the Ligue Contre le Cancer (to IA), Université Paul Sabatier de Toulouse (to IA), Allocation de thèse from the Fondation pour la Recherche Médicale (to CG and DM), Allocation de 4ème année de thèse from the Fondation ARC (to CG) and Bourse Angiogenèse from Roche (to OC). YM was a recipient of a post-doctoral fellow from Fondation de France and from Investissements d'Avenir (PHUC-CAPTOR).

REFERENCES

- Pyne NJ, Pyne S. Sphingosine 1-phosphate and cancer. *Nat Rev Cancer* 2010; **10**: 489–503.
- Pitson SM. Regulation of sphingosine kinase and sphingolipid signaling. *Trends Biochem Sci* 2011; **36**: 97–107.
- Maceyka M, Harikumar KB, Milstien S, Spiegel S. Sphingosine-1-phosphate signaling and its role in disease. *Trends Cell Biol* 2012; **22**: 50–60.
- Xia P, Gamble JR, Wang L, Pitson SM, Moretti PA, Wattenberg BW *et al*. An oncogenic role of sphingosine kinase. *Curr Biol* 2000; **10**: 1527–1530.
- Takabe K, Paugh SW, Milstien S, Spiegel S. "Inside-out" signaling of sphingosine-1-phosphate: therapeutic targets. *Pharmacol Rev* 2008; **60**: 181–195.
- Kawahara A, Nishi T, Hisano Y, Fukui H, Yamaguchi A, Mochizuki N. The sphingolipid transporter spns2 functions in migration of zebrafish myocardial precursors. *Science* 2009; **323**: 524–527.
- Fukuhara S, Simmons S, Kawamura S, Inoue A, Orba Y, Tokudome T *et al*. The sphingosine-1-phosphate transporter Spns2 expressed on endothelial cells regulates lymphocyte trafficking in mice. *J Clin Invest* 2012; **122**: 1416–1426.
- Nagahashi M, Kim EY, Yamada A, Ramachandran S, Allegood JC, Hait NC *et al*. Spns2, a transporter of phosphorylated sphingoid bases, regulates their blood and lymph levels, and the lymphatic network. *FASEB J* 2013; **27**: 1001–1011.
- Van Brocklyn JR, Lee MJ, Menzelev R, Olivera A, Edsall L, Cuvillier O *et al*. Dual actions of sphingosine-1-phosphate: extracellular through the Gi-coupled receptor Edg-1 and intracellular to regulate proliferation and survival. *J Cell Biol* 1998; **142**: 229–240.
- Hait NC, Allegood J, Maceyka M, Strub GM, Harikumar KB, Singh SK *et al*. Regulation of histone acetylation in the nucleus by sphingosine-1-phosphate. *Science* 2009; **325**: 1254–1257.
- Alvarez SE, Harikumar KB, Hait NC, Allegood J, Strub GM, Kim EY *et al*. Sphingosine-1-phosphate is a missing cofactor for the E3 ubiquitin ligase TRAF2. *Nature* 2010; **465**: 1084–1088.
- Cuvillier O. Downregulating sphingosine kinase-1 for cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets* 2008; **12**: 1009–1020.
- Sabbadini RA. Sphingosine-1-phosphate antibodies as potential agents in the treatment of cancer and age-related macular degeneration. *Br J Pharmacol* 2011; **162**: 1225–1238.
- Pyne S, Bittman R, Pyne NJ. Sphingosine kinase inhibitors and cancer: seeking the golden sword of Hercules. *Cancer Res* 2011; **71**: 6576–6582.
- Zhang Y, Wang Y, Wan Z, Liu S, Cao Y, Zeng Z. Sphingosine kinase 1 and cancer: a systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE* 2014; **9**: e90362.
- Zhang L, Wang X, Bullock AJ, Callea M, Shah H, Song J *et al*. Anti-S1P antibody as a novel therapeutic strategy for VEGFR TKI resistant renal cancer. *Clin Cancer Res* 2015; **21**: 1925–1934.
- Pchejetski D, Doumerc N, Golzio M, Naymark M, Teissie J, Kohama T *et al*. Chemosensitizing effects of sphingosine kinase-1 inhibition in prostate cancer cell and animal models. *Mol Cancer Ther* 2008; **7**: 1836–1845.
- Paugh SW, Paugh BS, Rahmani M, Kapitonov D, Almenara JA, Kordula T *et al*. A selective sphingosine kinase 1 inhibitor integrates multiple molecular therapeutic targets in human leukemia. *Blood* 2008; **112**: 1382–1391.
- Kapitonov D, Allegood JC, Mitchell C, Hait NC, Almenara JA, Adams JK *et al*. Targeting sphingosine kinase 1 inhibits Akt signaling, induces apoptosis, and suppresses growth of human glioblastoma cells and xenografts. *Cancer Res* 2009; **69**: 6915–6923.
- Pchejetski D, Boehler T, Brizuela L, Sauer L, Doumerc N, Golzio M *et al*. FTY720 (Fingolimod) sensitizes prostate cancer cells to radiotherapy by inhibition of sphingosine kinase-1. *Cancer Res* 2010; **70**: 8651–8661.
- O'Brien N, Jones ST, Williams DG, Cunningham HB, Moreno K, Visentin B *et al*. Production and characterization of monoclonal anti-sphingosine-1-phosphate antibodies. *J Lipid Res* 2009; **50**: 2245–2257.
- Visentin B, Vekich JA, Sibbald BJ, Cavalli AL, Moreno KM, Matteo RG *et al*. Validation of an anti-sphingosine-1-phosphate antibody as a potential therapeutic in reducing growth, invasion, and angiogenesis in multiple tumor lineages. *Cancer Cell* 2006; **9**: 225–238.
- Ponnusamy S, Selvam SP, Mehrotra S, Kawamori T, Snider AJ, Obeid LM *et al*. Communication between host organism and cancer cells is transduced by systemic sphingosine kinase 1/sphingosine 1-phosphate signalling to regulate tumour metastasis. *EMBO Mol Med* 2012; **4**: 761–775.
- Ader I, Gstaalder C, Bouquerel P, Golzio M, Andrieu G, Zalvidea S *et al*. Neutralizing S1P inhibits intratumoral hypoxia, induces vascular remodelling and sensitizes to chemotherapy in prostate cancer. *Oncotarget* 2015; **6**: 13803–13821.
- Semenza GL. Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. *Cell* 2012; **148**: 399–408.
- Semenza GL. Hypoxia-inducible factors: mediators of cancer progression and targets for cancer therapy. *Trends Pharmacol Sci* 2012; **33**: 207–214.
- Wiesener MS, Jurgensen JS, Rosenberger C, Scholze CK, Horstrup JH, Warnecke C *et al*. Widespread hypoxia-inducible expression of HIF-2α in distinct cell populations of different organs. *FASEB J* 2003; **17**: 271–273.
- Keith B, Johnson RS, Simon MC. HIF1α and HIF2α: sibling rivalry in hypoxic tumour growth and progression. *Nat Rev Cancer* 2012; **12**: 9–22.
- Kaelin WG Jr. Kidney cancer: now available in a new flavor. *Cancer Cell* 2008; **14**: 423–424.
- Rankin EB, Rha J, Unger TL, Wu CH, Shutt HP, Johnson RS *et al*. Hypoxia-inducible factor-2 regulates vascular tumorigenesis in mice. *Oncogene* 2008; **27**: 5354–5358.
- Gordan JD, Lal P, Dondeti VR, Letrero R, Parekh KN, Oquendo CE *et al*. HIF-α effects on c-Myc distinguish two subtypes of sporadic VHL-deficient clear cell renal carcinoma. *Cancer Cell* 2008; **14**: 435–446.
- Ader I, Brizuela L, Bouquerel P, Malavaud B, Cuvillier O. Sphingosine kinase 1: a new modulator of hypoxia inducible factor 1α during hypoxia in human cancer cells. *Cancer Res* 2008; **68**: 8635–8642.
- Cho SY, Lee HJ, Jeong SJ, Kim HS, Chen CY, Lee EO *et al*. Sphingosine kinase 1 pathway is involved in melatonin-induced HIF-1α inactivation in hypoxic PC-3 prostate cancer cells. *J Pineal Res* 2011; **51**: 87–93.
- Kalhor V, Kemppainen K, Asghar MY, Bergelin N, Jaakkola P, Tornquist K. Sphingosine-1-phosphate as a regulator of hypoxia-induced factor-1α in thyroid follicular carcinoma cells. *PLoS ONE* 2013; **8**: e66189.
- Toschi A, Lee E, Gadir N, Ohh M, Foster DA. Differential dependence of hypoxia-inducible factors 1 α and 2 α on mTORC1 and mTORC2. *J Biol Chem* 2008; **283**: 34495–34499.
- Brizuela L, Dayon A, Doumerc N, Ader I, Golzio M, Izard JC *et al*. The sphingosine kinase-1 survival pathway is a molecular target for the tumor-suppressive tea and wine polyphenols in prostate cancer. *FASEB J* 2010; **24**: 3882–3894.
- Padron D, Tall RD, Roth MG. Phospholipase D2 is required for efficient endocytic recycling of transferrin receptors. *Mol Biol Cell* 2006; **17**: 598–606.
- Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME *et al*. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* 1999; **399**: 271–275.
- Bertout JA, Majumdar AJ, Gordan JD, Lam JC, Ditsworth D, Keith B *et al*. HIF2α inhibition promotes p53 pathway activity, tumor cell death, and radiation responses. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; **106**: 14391–14396.
- Baba M, Hirai S, Yamada-Okabe H, Hamada K, Tabuchi H, Kobayashi K *et al*. Loss of von Hippel-Lindau protein causes cell density dependent deregulation of CyclinD1 expression through hypoxia-inducible factor. *Oncogene* 2003; **22**: 2728–2738.
- Raval RR, Lau KW, Tran MG, Sowter HM, Mandriota SJ, Li JL *et al*. Contrasting properties of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) and HIF-2 in von Hippel-Lindau-associated renal cell carcinoma. *Mol Cell Biol* 2005; **25**: 5675–5686.
- Gordan JD, Bertout JA, Hu CJ, Diehl JA, Simon MC. HIF-2α promotes hypoxic cell proliferation by enhancing c-myc transcriptional activity. *Cancer Cell* 2007; **11**: 335–347.
- Biswas S, Troy H, Leek R, Chung YL, Li JL, Raval RR *et al*. Effects of HIF-1α and HIF2α on growth and metabolism of clear-cell renal cell carcinoma 786-0 xenografts. *Journal of oncology* 2010; **2010**: 757908.
- Hara K, Yonezawa K, Kozłowski MT, Sugimoto T, Andrabi K, Weng QP *et al*. Regulation of eIF-4E BP1 phosphorylation by mTOR. *J Biol Chem* 1997; **272**: 26457–26463.
- Gringas AC, Gygi SP, Raught B, Polakiewicz RD, Abraham RT, Hoekstra MF *et al*. Regulation of 4E-BP1 phosphorylation: a novel two-step mechanism. *Genes Dev* 1999; **13**: 1422–1437.
- Rosen H, Gonzalez-Cabrera PJ, Sanna MG, Brown S. Sphingosine 1-phosphate receptor signaling. *Annu Rev Biochem* 2009; **78**: 743–768.
- Michaud MD, Robitaille GA, Gratton JP, Richard DE. Sphingosine-1-phosphate: a novel nonhypoxic activator of hypoxia-inducible factor-1 in vascular cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009; **29**: 902–908.
- Brizuela L, Martin C, Jeannot P, Ader I, Gstaalder C, Andrieu G *et al*. Osteoblast-derived sphingosine 1-phosphate to induce proliferation and confer resistance to therapeutics to bone metastasis-derived prostate cancer cells. *Mol Oncol* 2014; **8**: 1181–1195.
- Patel SA, Simon MC. Biology of hypoxia-inducible factor-2α in development and disease. *Cell Death Differ* 2008; **15**: 628–634.
- Jonasch E, Futreal PA, Davis IJ, Bailey ST, Kim WY, Brugarolas J *et al*. State of the science: an update on renal cell carcinoma. *Mol Cancer Res* 2012; **10**: 859–880.
- Kaelin WG. Von hippel-lindau disease. *Annu Rev Pathol* 2007; **2**: 145–173.

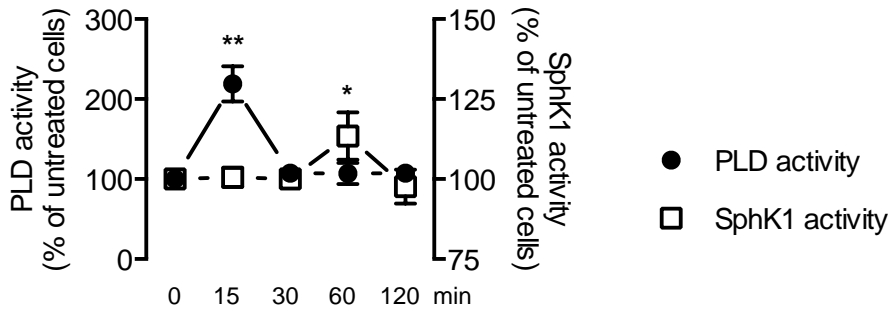
- 52 Kondo K, Kim WY, Lechpammer M, Kaelin WG Jr. Inhibition of HIF2 α is sufficient to suppress pVHL-defective tumor growth. *PLoS Biol* 2003; **1**: E83.
- 53 Zimmer M, Doucette D, Siddiqui N, Iliopoulos O. Inhibition of hypoxia-inducible factor is sufficient for growth suppression of VHL-/- tumors. *Mol Cancer Res* 2004; **2**: 89–95.
- 54 Shinjima T, Oya M, Takayanagi A, Mizuno R, Shimizu N, Murai M. Renal cancer cells lacking hypoxia inducible factor (HIF)-1 α expression maintain vascular endothelial growth factor expression through HIF-2 α . *Carcinogenesis* 2007; **28**: 529–536.
- 55 Beroukhi R, Brunet JP, Di Napoli A, Mertz KD, Seeley A, Pires MM *et al*. Patterns of gene expression and copy-number alterations in von-hippel lindau disease-associated and sporadic clear cell carcinoma of the kidney. *Cancer Res* 2009; **69**: 4674–4681.
- 56 Shen C, Beroukhi R, Schumacher SE, Zhou J, Chang M, Signoretti S *et al*. Genetic and functional studies implicate HIF1 α as a 14q kidney cancer suppressor gene. *Cancer discovery* 2011; **1**: 222–235.
- 57 Ader I, Malavaud B, Cuvillier O. When the sphingosine kinase-1/sphingosine 1-phosphate pathway meets hypoxia signaling: new targets for cancer therapy. *Cancer Res* 2009; **69**: 3723–3726.
- 58 Cuvillier O, Ader I, Bouquerel P, Brizuela L, Gstalder C, Malavaud B. Hypoxia, therapeutic resistance, and sphingosine 1-phosphate. *Adv Cancer Res* 2013; **117**: 117–141.
- 59 Anelli V, Gault CR, Cheng AB, Obeid LM. Sphingosine Kinase 1 Is Up-regulated during Hypoxia in U87MG Glioma Cells: ROLE OF HYPOXIA-INDUCIBLE FACTORS 1 AND 2. *J Biol Chem* 2008; **283**: 3365–3375.
- 60 Salama MF, Carroll B, Adada M, Pulkoski-Gross M, Hannun YA, Obeid LM. A novel role of sphingosine kinase-1 in the invasion and angiogenesis of VHL mutant clear cell renal cell carcinoma. *FASEB J* 2015; **29**: 2803–2813.
- 61 Toschi A, Edelstein J, Rockwell P, Ohh M, Foster DA. HIF α expression in VHL-deficient renal cancer cells is dependent on phospholipase D. *Oncogene* 2008; **27**: 2746–2753.
- 62 Delon C, Manifava M, Wood E, Thompson D, Krugmann S, Pyne S *et al*. Sphingosine kinase 1 is an intracellular effector of phosphatidic acid. *J Biol Chem* 2004; **279**: 44763–44774.
- 63 Liu XD, Yao J, Tripathi DN, Ding Z, Xu Y, Sun M *et al*. Autophagy mediates HIF2 α degradation and suppresses renal tumorigenesis. *Oncogene* 2015; **34**: 2450–2460.
- 64 Li Y, Li S, Qin X, Hou W, Dong H, Yao L *et al*. The pleiotropic roles of sphingolipid signaling in autophagy. *Cell Death Dis* 2014; **5**: e1245.
- 65 Cuvillier O. [Sphingosine 1-phosphate receptors: from biology to physiopathology]. *Med Sci (Paris)* 2012; **28**: 951–957.
- 66 Schnitzer SE, Weigert A, Zhou J, Brune B. Hypoxia enhances sphingosine kinase 2 activity and provokes sphingosine-1-phosphate-mediated chemoresistance in A549 lung cancer cells. *Mol Cancer Res* 2009; **7**: 393–401.
- 67 Costa LJ, Drabkin HA. Renal cell carcinoma: new developments in molecular biology and potential for targeted therapies. *Oncologist* 2007; **12**: 1404–1415.
- 68 Pchejetski D, Golzio M, Bonhoure E, Calvet C, Doumerc N, Garcia V *et al*. Sphingosine kinase-1 as a chemotherapy sensor in prostate adenocarcinoma cell and mouse models. *Cancer Res* 2005; **65**: 11667–11675.
- 69 Brizuela L, Cuvillier O. Biochemical methods for quantifying sphingolipids: ceramide, sphingosine, sphingosine kinase-1 activity, and sphingosine-1-phosphate. *Methods Mol Biol* 2012; **874**: 1–20.
- 70 Martineau Y, Azar R, Muller D, Lasfargues C, El Khawand S, Anesia R *et al*. Pancreatic tumours escape from translational control through 4E-BP1 loss. *Oncogene* 2014; **33**: 1367–1374.



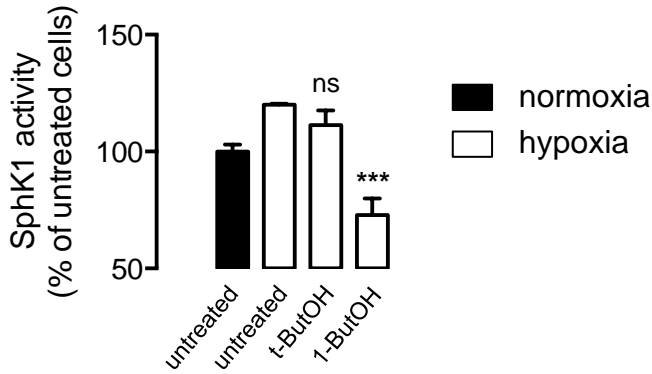
Oncogenesis is an open-access journal published by Nature Publishing Group. This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Supplementary Information accompanies this paper on the *Oncogenesis* website (<http://www.nature.com/oncsis>)

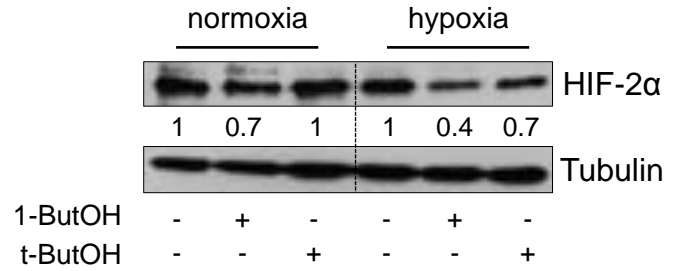
A.



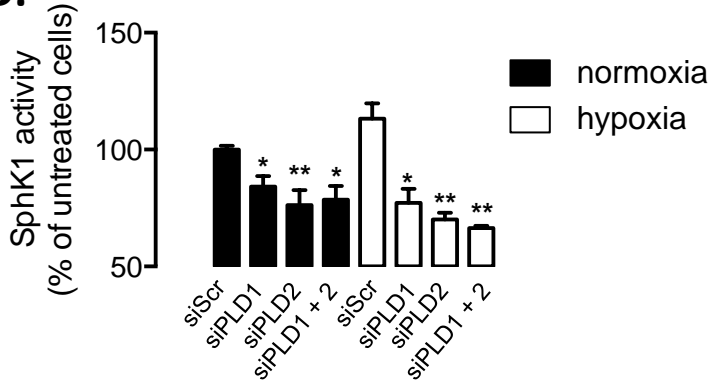
B.



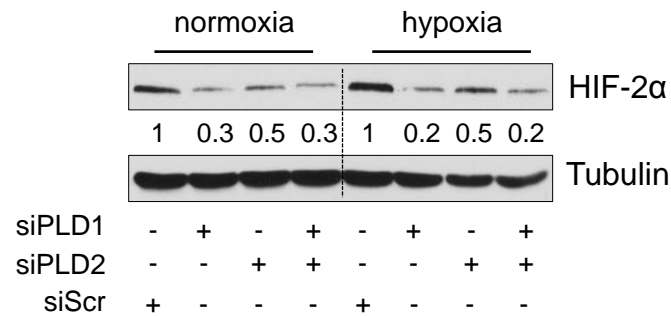
C.



D.



E.



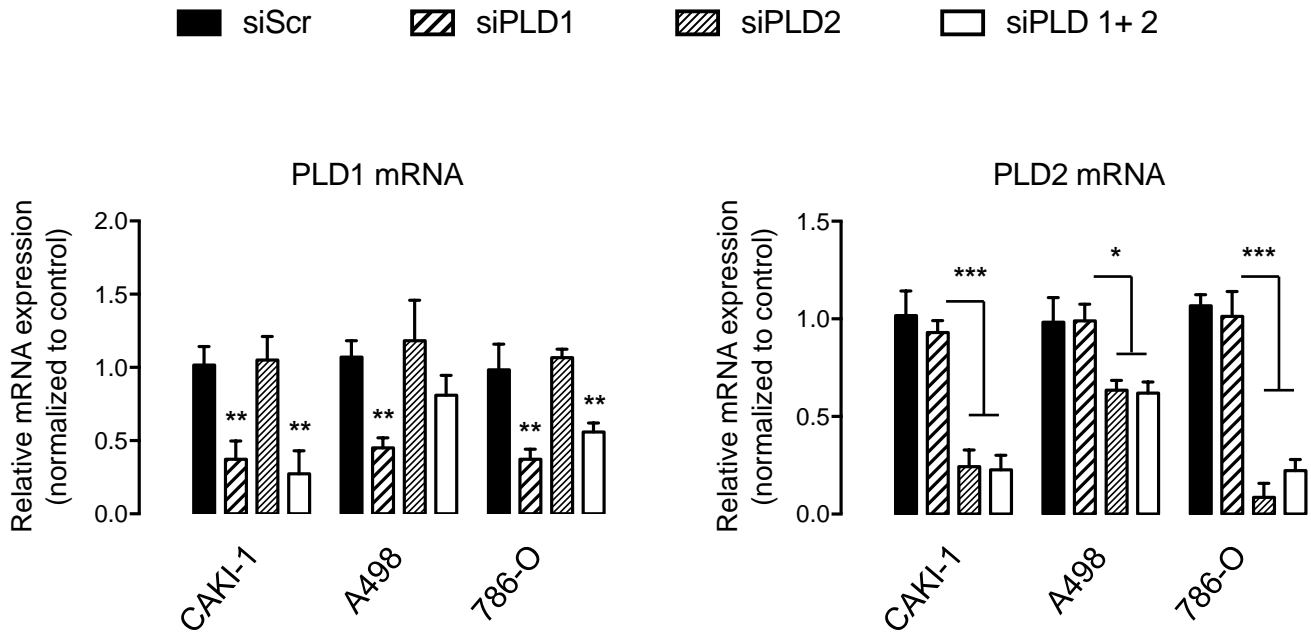
Phospholipase D regulates SphK1-dependent HIF-2α expression in 786-O cells

A, cells were incubated under hypoxia for the indicated times and then tested for PLD and SphK1 enzymatic activities. *Points*, mean of at least three experiments; *bars*, SEM. The two-tailed P values between the means of hypoxic cells are : *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$.

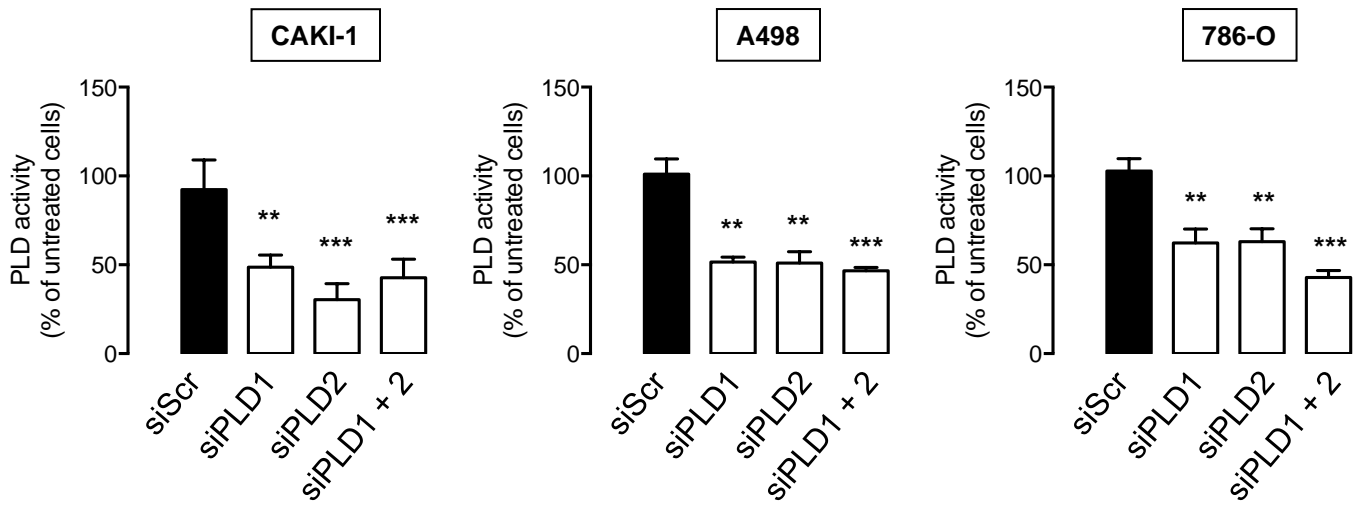
B-C, cells were untreated or treated with 1-butanol (1-ButOH) or tert butanol (t-ButOH) as control (0.8%). SphK1 activity (**B**) and HIF-2α expression (**C**) were determined after 1h and 6h of hypoxia, respectively. Similar results were obtained in at least three independent experiments, and equal loading was monitored using antibody to α-tubulin. *Columns*, mean of three independent experiments; *bars*, SEM. The two-tailed P values between the means of hypoxic cells are : ***, $P < 0.001$.

D-E, cells were transfected with siPLD1 (50 nmol/L), siPLD2 (50 nmol/L) or siPLD1 (50 nmol/L) and siPLD2 (50 nmol/L) or scrambled siRNA (siScr, 50 nmol/L) for 72h then incubated under normoxia or hypoxia. SphK1 activity (**D**) and HIF-2α expression (**E**) were determined after 1h and 6h of hypoxia, respectively. Similar results were obtained in at least three independent experiments, and equal loading was monitored using antibody to α-tubulin. *Columns*, mean of three independent experiments; *bars*, SEM. The two-tailed P values between the means of hypoxic cells are : *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$.

A.

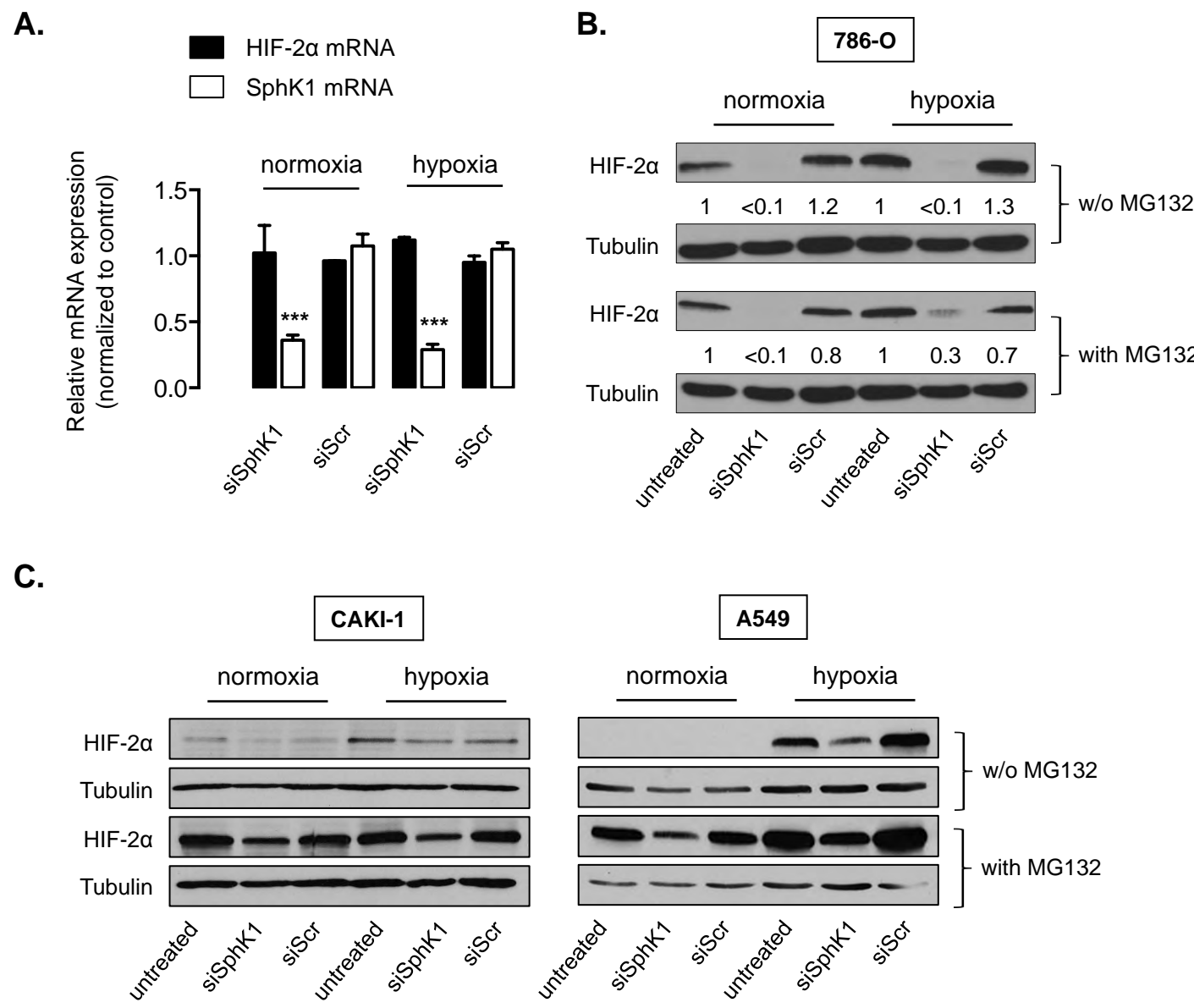


B.



Validation of siRNA against PLD1 and 2 isoforms

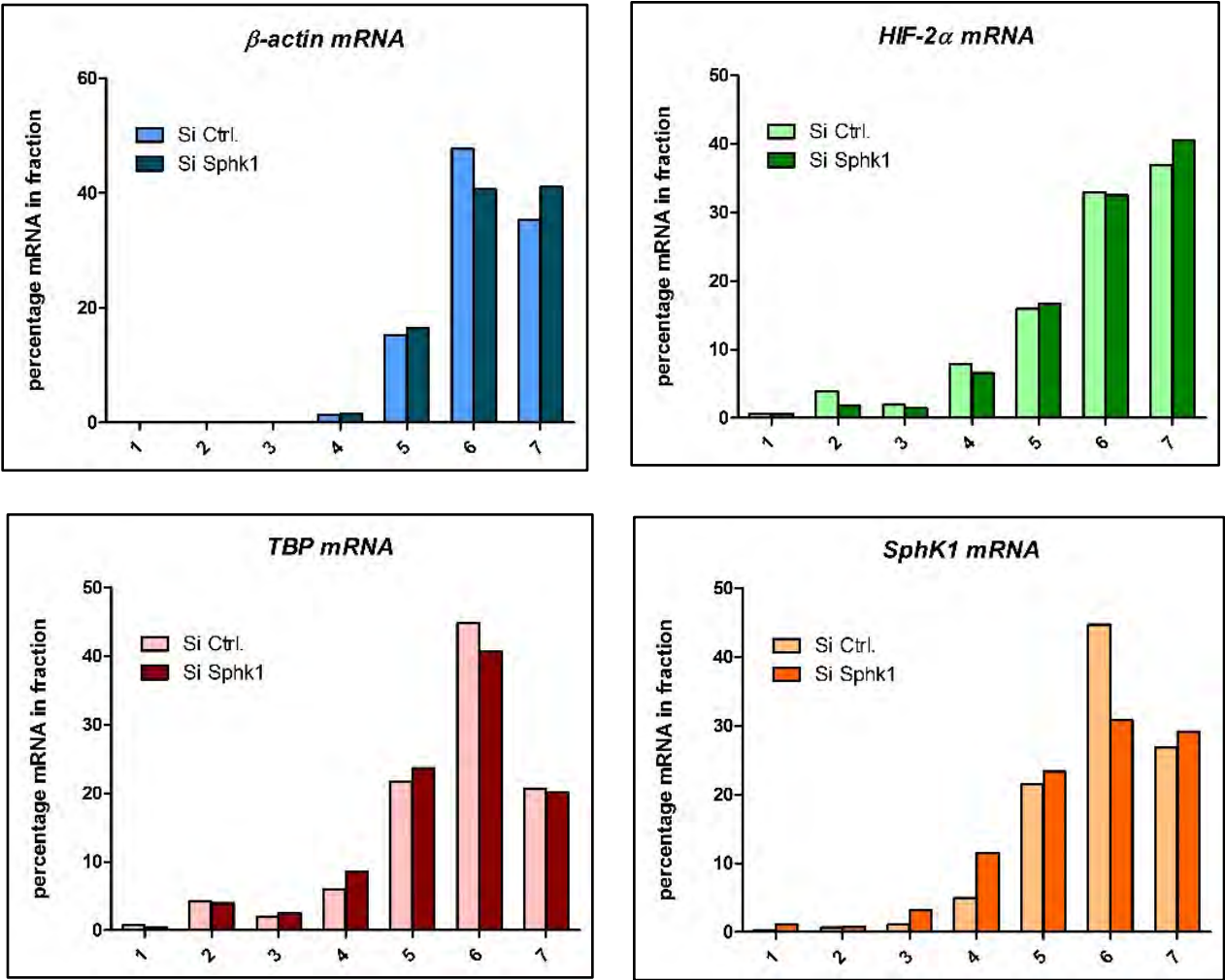
CAKI-1, A498 and 786-O cells were transfected with siPLD1 (50 nmol/L), siPLD2 (50 nmol/L) or siPLD1 (50 nmol/L) and siPLD2 (50 nmol/L) or scrambled siRNA (siScr, 50 nmol/L) for 72h then assayed for mRNA expression (**A**) or enzymatic PLD activity (**B**). Columns, mean of at least three independent experiments; bars, SEM. The two-tailed P values between the means of hypoxic cells are : *, P<0.05; **, P<0.01; ***, P<0.001.



SphK1 regulates proteasome-independent HIF-2α degradation in VHL-defective 786-O cells in VHL wild-type CAKI-1 and A549 cells

A, relative mRNA expression of HIF-2α and SphK1 expression in 786-O cells was measured after 72h of treatment with 20 nmol/l of siSphK1 or scrambled siRNA (siScr) followed by 6h under normoxic or hypoxic condition. Columns, mean of at least four independent experiments; bars, SEM. ***, P<0.001. **B**, 786-O cells were untransfected or transfected with 20 nmol/l of siSphK1 or scrambled siRNA (siScr) for 72h before the experiments. Cells were then incubated for 6h under normoxic or hypoxic condition in presence or absence of the proteasome inhibitor MG132 (10 μM). Cell lysates were assayed for HIF-2α expression by Western blot analysis. Similar results were obtained in three independent experiments, and equal loading was monitored using antibody to tubulin.

C, CAKI-1 and A549 cells were untransfected or transfected with 20 nmol/l of siSphK1 or scrambled siRNA (siScr) for 72h before the experiments. Cells were then incubated for 6h under normoxic or hypoxic condition in presence or absence of the proteasome inhibitor MG132 (10 μM). Cell lysates were assayed for HIF-2α expression by Western blot analysis. Similar results were obtained in three independent experiments, and equal loading was monitored using antibody to tubulin.

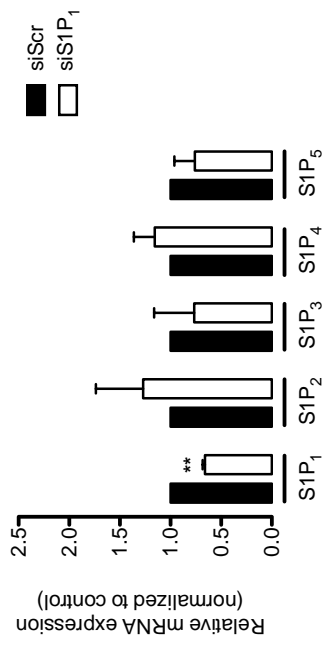


Distribution of mRNA along polysomes fractions.

RNA were extracted from fractions indicated in Fig 5D and quantified by RT-qPCR for the indicated mRNA. Results are presented as relative distribution in percent for each fraction.

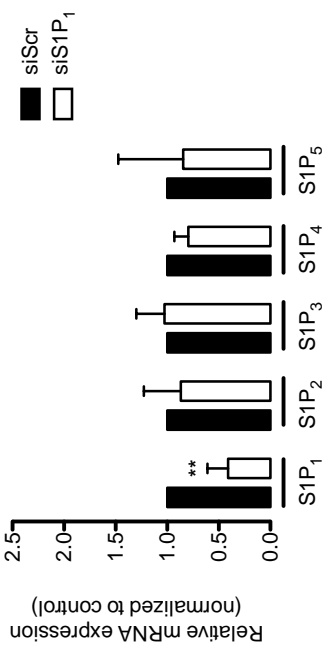
A.

A498



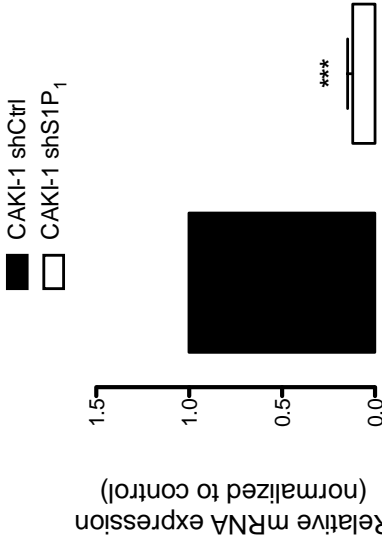
B.

CAKI-1



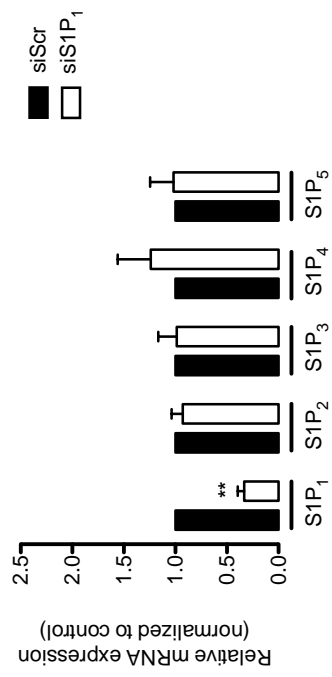
Bouquerel et al. (Suppl. Fig 5)

E.



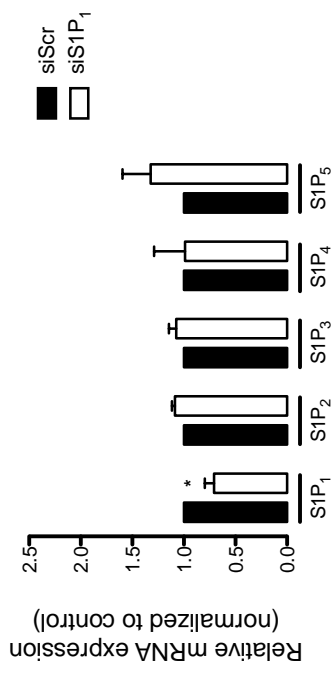
C.

PC-3



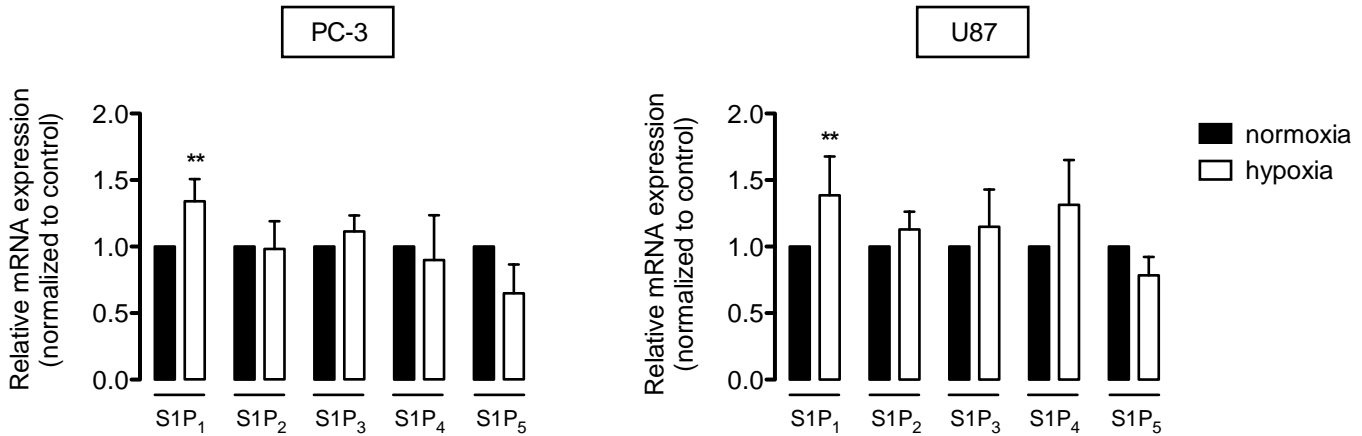
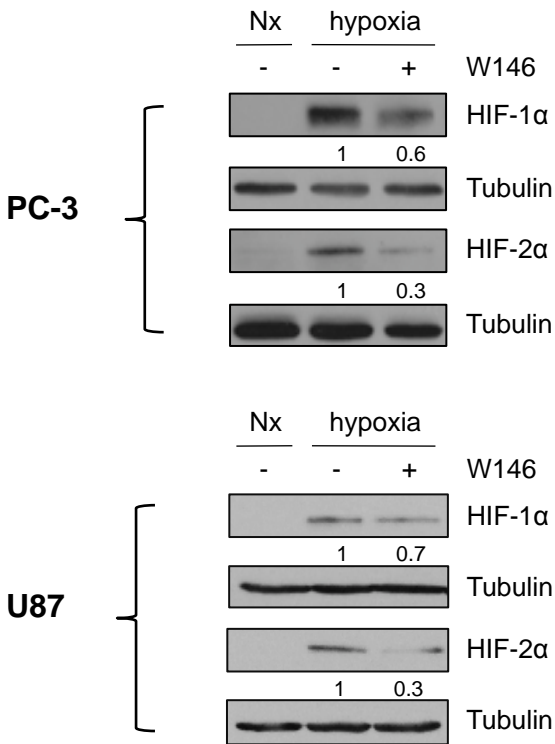
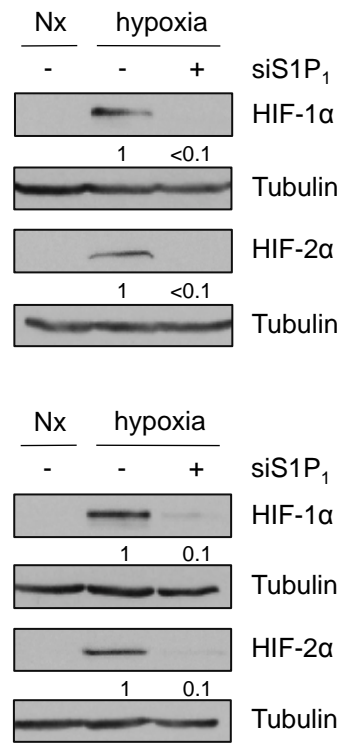
D.

U87



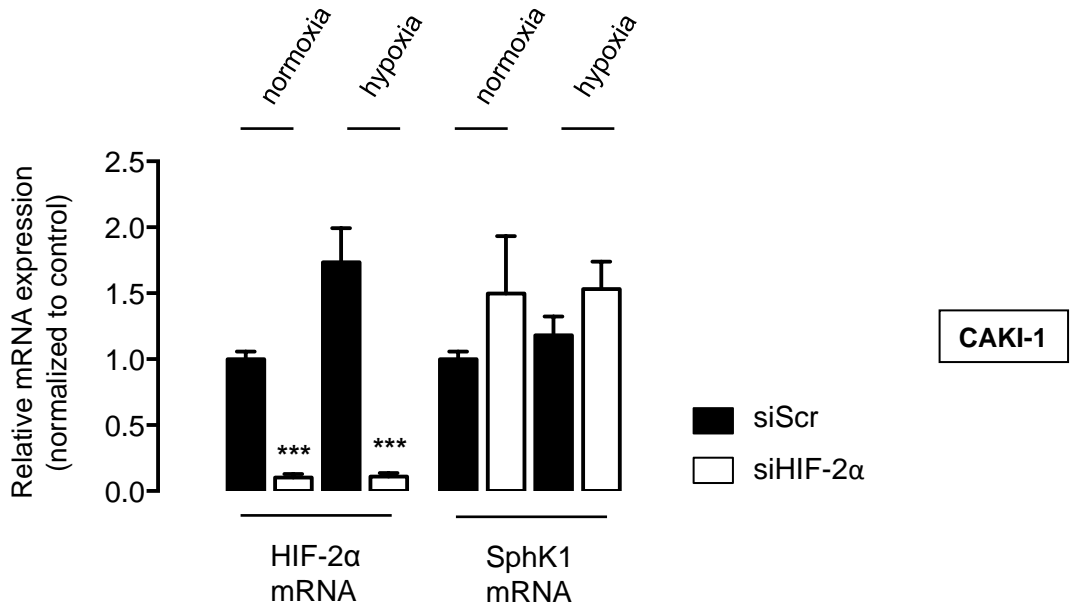
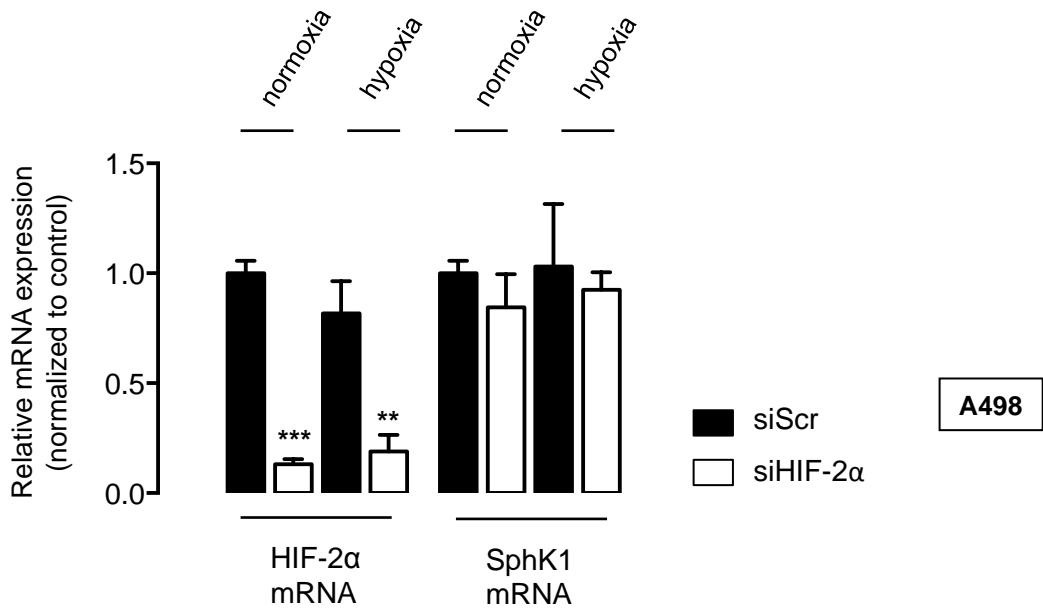
Validation of RNA interference strategies against S1P₁

A-D, A498 (**A**), CAKI-1 (**B**), PC-3 (**C**) and U87 (**D**) cells were transfected with 50 nmol/l of siS1P₁ or scrambled siRNA (siScr) for 72h, then assayed for relative S1P₁₋₅ mRNA expression. Columns, mean of at least three independent experiments; bars, SEM. *, P<0.05; **, P<0.01. **E**, Relative S1P₁ mRNA expression in CAKI-1 shCtrl (black) and CAKI-1 shS1P₁ (white) cells. Columns, mean of three independent experiments; bars, SEM. ***, P<0.001.

A.**B.****C.**

S1P₁ regulates both HIF-1α and HIF-2α accumulation in PC-3 and U87 cells under hypoxia

A, the relative mRNA expression of S1P₁₋₅ in PC-3 and U87 was measured after 1h of incubation under normoxic (black) or hypoxic (white) conditions. *Columns*, mean of at least five independent experiments; *bars*, SEM. **, $P < 0.01$. **B**, PC-3 and U87 cells were treated with W146 (5μM) or ethanol (control), then incubated under normoxia (Nx) or hypoxia for 6h. HIF-1α and HIF-2α expression were analyzed by immunoblotting. **C**, PC-3 and U87 cells were transfected with 50 nmol/l of siS1P₁ or scrambled siRNA for 72h, then incubated under normoxia (Nx) or hypoxia for an additional 6h. Cell lysates were assayed for HIF-1α and HIF-2α expression by immunoblotting. For all experiments, similar results were obtained in at least three independent experiments, and equal loading was monitored using antibody to tubulin.

A.**B.**

HIF-2 activity does not regulate SphK1 mRNA expression

relative mRNA expression of HIF-2α and SphK1 expression in CAKI-1 (**A**) and A498 (**B**) cells was measured after 72h of treatment with 20 nmol/l of siHIF-2α or scrambled siRNA (siScr) followed by 6h under normoxic or hypoxic condition. Columns, mean of at least five independent experiments; bars, SEM. **, p < 0.01; ***, p < 0.001.

Targeting protein synthesis in cancer cells

Yvan Martineau, David Müller and Stéphane Pyronnet

The G1 and S phases of the mitotic cell cycle normally insure that the parental cell attains a sufficient mass so as each daughter cell will have a size identical to that of the parental cell. This implies that before division cells must double their protein content, a process achieved through increase in protein synthesis. The most regulated step of protein synthesis is the initiation of mRNA translation into protein. Ribosome recruitment at the mRNA 5' end is actually controlled by the mRNA 5' cap binding protein eIF4E (eukaryotic translation initiation factor 4E) whose activity is inhibited by the hypophosphorylated forms of 4E-BPs (eIF4E-binding proteins 1 and 2) [1]. Upon mitogenic stimuli, mTOR phosphorylates 4E-BP1 and 4E-BP2 and the protein kinases S6K1 and S6K2 (S6Ks). 4E-BPs phosphorylation releases eIF4E which can interact with eIF4G itself bound to the RNA helicase eIF4A and to eIF3. Activated S6Ks phosphorylate eIF3 [2] and translation initiation is enhanced via eIF3-dependent recruitment of the 40S small ribosomal subunit and its subsequent joining with the large 60S subunit at the AUG initiator codon (Fig. 1).

Consistent with a role of mTOR in G1-S transition, mTOR inhibitors have been promising in the treatment of various cancers. However, although they yielded encouraging results in certain tumors, they remained often disappointing including in pancreatic cancer [3]. These failures can be explained at least in part by the loss of an mTOR-dependent feedback loop which normally restrains AKT activity (Fig. 1, red dotted inhibitory arrow, indirect effect). Indeed, upon pharmacological inhibition of mTOR, such feedback no longer exists and sustained AKT activity elicits other protumoral targets.

Another mechanism which can account for the inefficacy of mTOR inhibitors in pancreatic cancer has been recently highlighted. Although 4E-BP1 is highly expressed in the exocrine pancreas, we have actually found that a primary resistance to mTOR inhibitors exists in pancreatic cancer cells due to the dramatic downregulation of 4E-BP1 expression that accompanies pancreatic cell carcinogenesis. 4E-BP2 is poorly expressed in normal and cancer cells of the pancreas. The absence of 4E-BP1 and 4E-BP2 in pancreatic cancer cells prevents G1 phase inhibition by mTOR inhibitors owing to a less effective repression of general protein synthesis and, more specifically, to a lack in the repression of cyclin D1 post-transcriptional expression [4]. Consistently, the eIF4E/4E-BPs ratio is inversely correlated to the efficacy of mTOR inhibitors, and an acquired resistance to mTOR inhibitors

occurs progressively when cells are chronically exposed to sub-lethal concentrations of mTOR inhibitors due to downregulation of 4E-BPs expression [5].

One alternative in targeting protein synthesis for the treatment of tumors resistant to mTOR inhibitors is to act on the pathway downstream of mTOR. This option can be envisioned for cancer cells lacking the mTOR targets 4E-BP1 and 4E-BP2 (due to either a primary or an acquired loss of expression, see above). In these cases, mimicking 4E-BPs' function independently of mTOR manipulation would have the double advantage of blocking protein synthesis while maintaining the negative feedback loop on other AKT-dependent protumoral pathways (Fig. 1). In support of this hypothesis, we have obtained encouraging data at least in cultured pancreatic cancer cells, where one 4E-BP mimic (4E2RCat) efficiently blocked protein synthesis and cell proliferation independently of 4E-BPs levels, while the effects of mTOR inhibitors remained dependent on sufficient 4E-BPs intracellular amounts [4]. 4E2RCat has been isolated by the group of Jerry Pelletier after screening of compounds preventing eIF4E interaction with eIF4G and therefore blocking protein synthesis (Fig. 1). Another related 4E-BP mimic (4E1RCat) has been shown by the same group to efficiently reverse chemoresistance in a mouse lymphoma model [6]. The

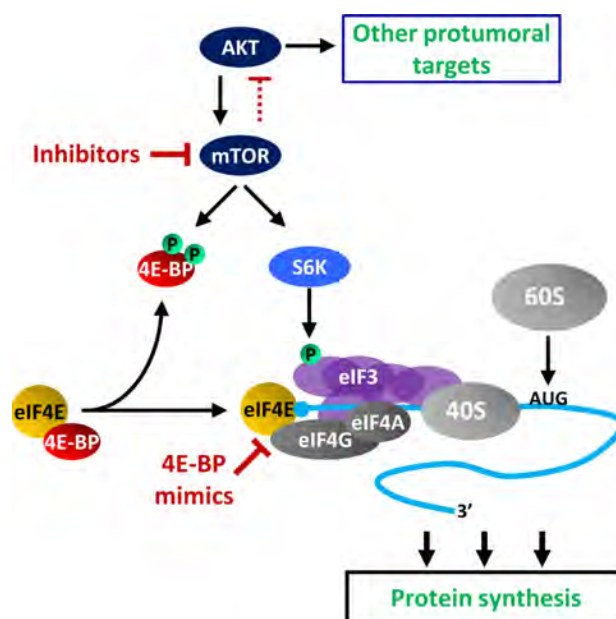


Figure 1: 4E-BP mimics as an alternative to mTOR inhibitors.

need for alternatives to mTOR inhibitors in lymphoma is further supported by a recent paper indicating that not all lymphoma-derived cell lines express 4E-BP1 and that lymphoma cells lacking 4E-BP1 are resistant to mTOR inhibitors [7].

Thus, the “addiction” of cancer cells to protein synthesis appears as a druggable vulnerability which merits further investigations. This is particularly true for pancreatic tumors expressing very low levels of 4E-BP1 and 4E-BP2 and which are resistant to mTOR inhibitors. In a near future, the combination of 4E-BPs mimics with conventional chemotherapies may provide therapeutic interests.

Stéphane Pyronnet: INSERM UMR-1037, Université de Toulouse, Equipe Labellisée Ligue Contre le Cancer, Laboratoire d'Excellence Toulouse Cancer: TOUCAN, Toulouse, France

Correspondence: Stéphane Pyronnet, **email** stephane.pyronnet@inserm.fr

Received: June 27, 2014;

Published: July 4, 2014;

REFERENCES

1. Martineau Y, et al. *Oncogene* 2013; 32: 671-7.
2. Martineau Y, et al. *Mol Cell Biol* 2014; 34:1046-53.
3. Wolpin BM, et al. *J Clin Oncol* 2008; 26: 3222-8.
4. Martineau Y, et al. *Oncogene* 2014; 33: 1367-74.
5. Alain T, et al. *Cancer Res* 2012; 72: 6468-76.
6. Cencic R, et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108: 6689.
7. Mallya S, et al. *PLoS One* 2014; 9: e88865.



Available online at
ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
EM|consulte
www.em-consulte.com/en



COMMENTARY

Imbalanced splicing in MAPK signaling sustains Ras-induced transformation

David Müller, Yvan Martineau, Corinne Bousquet, Stéphane Pyronnet*



Inserm UMR-1037, Laboratoire d'excellence Toulouse Cancer: TOUCAN, Équipe labellisée ligue contre le cancer, Université de Toulouse, 31432 Toulouse, France

Available online 20 November 2014

Summary Increasingly, evidence suggests that phosphorylation of the mRNA translation initiation factor eIF4E plays an important role in carcinogenesis, downstream of Ras. The eIF4E factor is phosphorylated by MAPK-interacting protein kinases 1 and 2 (MNK1 and MNK2). Due to alternative splicing, two MNK2 proteins exist (MNK2a and MNK2b). While MNK2a possesses a binding site for the stress-induced p38-MAPK, MNK2b does not. Recently, Maimon et al. revealed that a splicing shift towards the MNK2b isoform, in Ras-activated cells, sustains transformation, due to a defect in p38-induced cell death, while the MNK2b-dependent phosphorylation of eIF4E is maintained.

© 2014 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

The MAPK signalling pathway is composed of a plethora of protein kinases, with many different substrates, involved in multiple functions. Two such kinases are the MAPK-interacting protein kinases 1 and 2 (MNK1 and MNK2), which phosphorylate the translation initiation factor eIF4E [1,2]. Phosphorylation of eIF4E is particularly elevated in cancer cells, such as pancreatic tumors, as MAPK activity is enhanced secondary to a Ras mutation [3]. Consistently, MNK1 and MNK2 null phenotype and eIF4E phosphorylation ablation models, have restrained transformation [4,5]. MNK1 and MNK2 are encoded by two distinct genes named *mknk1* and *mknk2* (hereafter called *Mnk1* and *Mnk2*). The

Mnk2 transcript is subject to alternative splicing, yielding two protein isoforms, MNK2a and MNK2b (Fig. 1a). Such diversity in the MNK protein family raises the question of functional redundancy, or alternatively, a specific function carried out by each member. Recently, Maimon et al. provided experimental evidence suggesting that the MNK2a and 2b isoforms play antagonistic but balanced anti- and pro-tumoral functions, respectively [6]. They further demonstrated that a shift in *Mnk2* splicing, in favor of the MNK2b pro-tumoral isoform, occurs in breast, lung, colon and pancreatic Ras-transformed cells, which sustains Ras-induced transformation.

Mechanistically, Maimon et al. showed that the diverse functions of the MNK2 isoforms are due to the existence of a MAPK-binding motif on the C-terminus of the longer form MNK2a (Fig. 1a). Under stress conditions (such

* Corresponding author.

E-mail address: stephane.pyronnet@inserm.fr (S. Pyronnet).

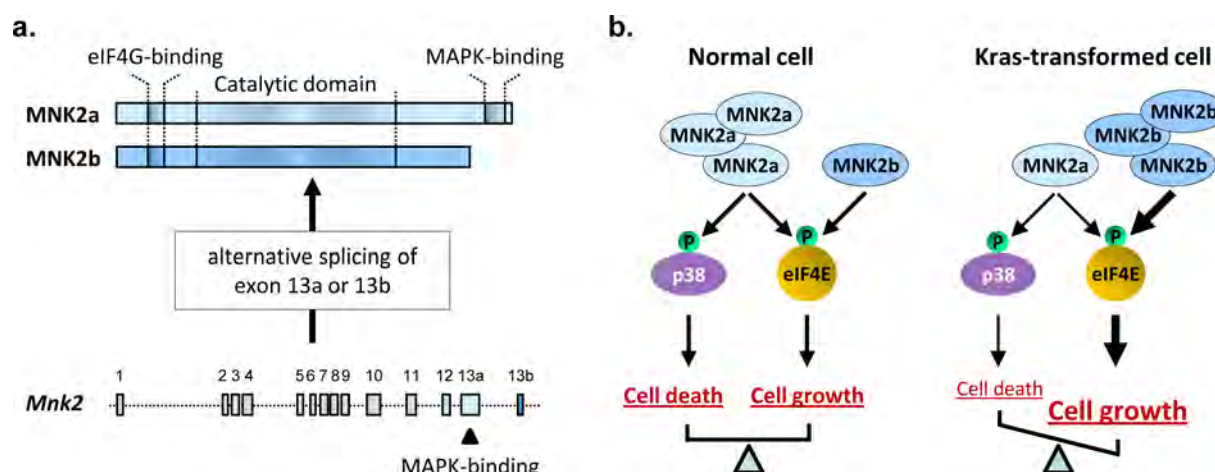


Figure 1 a: MNK2a and MNK2b isoforms are yielded from alternative splicing of *Mnk2* pre-mRNA. The first 12 exons are common to both isoforms and contain the catalytic domain and an eIF4G-binding domain. MNK2a or 2b interaction with eIF4G facilitates eIF4E phosphorylation [8]. Exon 13a of the MNK2a isoform contains a MAPK-binding domain, while exon 13b of the MNK2b does not; b: in non-transformed cells, the eIF4E-dependent cell growth function of MNK2b is counterbalanced by the p38-MAPK-dependent pro-apoptotic function of MNK2a. In Ras-transformed cells, a shift in *Mnk2* pre-mRNA alternative splicing, in favor of the MNK2b isoform, supports eIF4E-dependent cell growth and sustains Ras-induced carcinogenesis.

as osmotic shock), p38-MAPK binding to, and activation by MNK2a enhances its nuclear translocation and subsequent activation of its pro-apoptotic program. However, in Ras-transformed cells, a preferential splicing favoring the MNK2b isoform, which lacks the p38-MAPK-binding site, correlates with a defect in stress-induced apoptosis (Fig. 1b). Therefore, to establish a causal link between imbalanced *Mnk2* pre-mRNA splicing and apoptotic defects, the authors designed an elegant experiment aimed at controlling endogenous *Mnk2* alternative splicing by the use of different anti-sense oligonucleotides to mask each isoform-specific splicing site. It was found that promoting MNK2a synthesis restored sensitivity to stress- and p38-MAPK-induced apoptosis, whilst promoting MNK2b synthesis supported survival. Because both the MNK2a and 2b isoforms can equally stimulate eIF4E phosphorylation upon Ras activation, cell growth signals elicited downstream of phosphorylated eIF4E remained high, despite imbalanced *Mnk2* alternative splicing, and may therefore sustain Ras-mediated transformation (Fig. 1b). Furthermore, the search for upstream events, which could be responsible for imbalanced *Mnk2* alternative splicing, yielded the observation that the splicing modulator and oncoprotein SF2/ASF is overexpressed in Ras-transformed cells. This observation is of particular interest because previous data revealed that SF2/ASF supports *Mnk2* splicing in favor of the MNK2b oncogenic isoform [7].

Altogether, these data establish *Mnk2* alternative splicing as an important SF2/ASF target, promoting Ras-dependent carcinogenesis through eIF4E phosphorylation.

Disclosure of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest concerning this article.

Funding: D.M. is funded by LNCC. Y.M. is funded by Investissements d'Avenir, Programme Hospitalo-Universitaire en Cancérologie (CAPTOR).

References

- [1] Waskiewicz AJ, Flynn A, Proud CG, Cooper JA. Mitogen-activated protein kinases activate the serine/threonine kinases Mnk1 and Mnk2. *EMBO J* 1997;16(8):1909–20.
- [2] Pyronnet S. Phosphorylation of the cap-binding protein eIF4E by the MAPK-activated protein kinase Mnk1. *Biochem Pharmacol* 2000;60(8):1237–43.
- [3] Martineau Y, Azar R, Müller D, Lasfargues C, El Khawand S, Anesia R, et al. Pancreatic tumours escape from translational control through 4E-BP1 loss. *Oncogene* 2014;33(11):1367–74.
- [4] Ueda T, Sasaki M, Elia AJ, Chio II, Hamada K, Fukunaga R, et al. Combined deficiency for MAP kinase-interacting kinase 1 and 2 (Mnk1 and Mnk2) delays tumor development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107(32):13984–90.
- [5] Furic L, Rong L, Larsson O, Koumakpayi IH, Yoshida K, Brueschke A, et al. eIF4E phosphorylation promotes tumorigenesis and is associated with prostate cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107(32):14134–9.
- [6] Maimon A, Mogilevsky M, Shilo A, Golan-Gerstl R, Obiedat A, Ben-Hur V, et al. Mnk2 alternative splicing modulates the p38-MAPK pathway and impacts Ras-induced transformation. *Cell Rep* 2014;7(2):501–13.
- [7] Karni R, de Stanchina E, Lowe SW, Sinha R, Mu D, Krainer AR. The gene encoding the splicing factor SF2/ASF is a proto-oncogene. *Nat Struct Mol Biol* 2007;14(3):185–93.
- [8] Pyronnet S, Imataka H, Gingras AC, Fukunaga R, Hunter T, Sonenberg N. Human eukaryotic translation initiation factor 4G (eIF4G) recruits mnk1 to phosphorylate eIF4E. *EMBO J* 1999;18(1):270–9.

Table 1 :

chipID	GeneSymbol	PP242 FC (log2)	PP242 FDR
16	AARS	-0,722119698	0,000503715
55347	ABHD10	-0,793795273	5,20E-05
39	ACAT2	-1,423013509	1,03E-05
65057	ACD	-0,71157867	0,000308383
22985	ACIN1	-0,662652349	0,001601943
60	ACTB	-0,717440684	0,016338566
97	ACYP1	-0,76733161	0,002215638
135	ADORA2A	-0,788720647	0,048467101
84632	AFAP1L2	-0,756430548	0,000465707
8540	AGPS	-0,613402869	0,00264513
10598	AHSA1	-0,656420602	0,003680415
204	AK2	-0,673862433	0,001312464
64577	ALDH8A1	-0,624666658	0,053940092
79053	ALG8	-0,716101783	0,002213064
10189	ALYREF	-0,705445422	0,000359494
84250	ANKRD32	-1,189306272	4,36E-06
129138	ANKRD54	-0,732341957	0,000183638
54443	ANLN	-1,576113229	1,46E-05
8125	ANP32A	-0,620008156	0,001901294
1175	AP2S1	-0,781613396	8,51E-05
9582	APOBEC3B	-1,060977682	5,48E-05
79135	APOO	-0,775839429	0,020203903
378	ARF4	-0,598902126	0,015796917
384	ARG2	-0,690373696	0,025822326
9824	ARHGAP11A	-1,115800983	0,000143309
200894	ARL13B	-0,750772242	0,000346069
55156	ARMC1	-0,598419535	0,000587982
140462	ASB9	-0,961690145	0,023186597
25842	ASF1A	-0,763478997	0,002540984
55723	ASF1B	-1,352733014	0,000131953
440	ASNS	-1,422727185	0,002311415
259266	ASPM	-0,835506407	0,001989641
80150	ASRGL1	-0,818681011	0,000143309
29028	ATAD2	-1,513447838	2,38E-06
79915	ATAD5	-0,917208346	0,008244949
481	ATP1B1	-0,776404593	0,004460199
516	ATP5G1	-0,672961997	0,000842218
523	ATP6V1A	-0,670642542	0,002205835
84126	ATRIP	-0,63523753	0,005702258
6790	AURKA	-1,460153496	4,77E-06
9212	AURKB	-1,709426369	1,71E-06
60370	AVPI1	-0,806762861	0,004739619
9532	BAG2	-0,797026751	0,001989641
9531	BAG3	-0,710413093	0,000258279
580	BARD1	-1,186951789	5,72E-05
581	BAX	-0,616068833	0,149415543
586	BCAT1	-0,851906804	0,051661725
83596	BCL2L12	-0,650568876	0,003116023
622	BDH1	-0,641974527	0,000426856
332	BIRC5	-0,984556717	5,48E-05

641	BLM	-1,440392007	1,00E-05
642	BLMH	-0,837880932	8,84E-05
388962	BOLA3	-0,948988746	0,000250275
79866	BORA	-1,047430874	8,16E-05
10380	BPNT1	-0,741294543	0,003487701
672	BRCA1	-1,133825993	8,00E-05
675	BRCA2	-1,003656401	3,37E-05
83990	BRIP1	-0,860388167	0,000352258
25874	BRP44	-0,738111472	0,000537953
10950	BTG3	-0,795591521	0,003800817
699	BUB1	-1,108669214	9,38E-06
701	BUB1B	-1,2864848	4,12E-06
9184	BUB3	-0,627592993	0,001179728
84811	BUD13	-0,692085746	0,000148212
51501	C11orf73	-0,602914476	0,069106091
220042	C11orf82	-0,761722209	0,000885155
84915	C12orf34	-0,652576923	0,011902416
57103	C12orf5	-0,834846766	0,00033551
283643	C14orf80	-0,635189088	0,003141014
90417	C15orf23	-0,832478203	0,000144147
90381	C15orf42	-0,906445434	0,000510504
84419	C15orf48	-0,931745458	0,011122948
80178	C16orf59	-0,710066903	0,002252674
494514	C18orf56	-0,841071176	0,000261143
55732	C1orf112	-1,630824916	8,09E-06
79000	C1orf135	-0,850673758	0,001298432
339448	C1orf174	-0,597983984	0,001099449
140706	C20orf160	-0,992282462	0,000519955
92667	C20orf72	-0,62135723	0,001192494
56941	C3orf37	-0,638095161	0,000661723
54969	C4orf27	-0,811153861	0,00014272
201725	C4orf46	-0,817488209	0,001551418
375444	C5orf34	-1,244341057	5,39E-05
79624	C6orf211	-0,681584367	0,000557118
55071	C9orf40	-0,892896971	0,000178349
81928	CABLES2	-0,822846051	0,000227179
55832	CAND1	-0,635086636	0,000313127
833	CARS	-0,754326073	0,005478262
57082	CASC5	-0,658680505	0,006102599
9994	CASP8AP2	-0,720632322	0,00230183
865	CBFB	-0,59419149	0,001980094
55013	CCDC109B	-0,658812587	0,001665879
165055	CCDC138	-0,79005828	0,000265391
126661	CCDC163P	-0,688013466	0,006689919
79140	CCDC28B	-0,929056676	0,000331626
253635	CCDC75	-0,668996492	0,010769452
84318	CCDC77	-1,038753203	0,001125679
54908	CCDC99	-1,121824115	0,00033823
890	CCNA2	-1,404403267	5,31E-06
891	CCNB1	-1,01063914	2,46E-05
9133	CCNB2	-0,93414994	0,00016213
896	CCND3	-1,033616356	0,000165034
9134	CCNE2	-1,582981047	5,98E-05
899	CCNF	-1,035234432	2,36E-05

9738	CCP110	-0,634148484	0,005037041
991	CDC20	-0,825944125	0,000372852
8697	CDC23	-0,766366504	0,000994142
993	CDC25A	-1,187897776	0,001879303
995	CDC25C	-0,892072237	0,000248978
8318	CDC45	-1,940270988	2,04E-05
990	CDC6	-2,52553778	1,01E-05
8317	CDC7	-1,14197651	3,40E-05
157313	CDCA2	-1,345584188	2,31E-05
83461	CDCA3	-1,315422983	5,31E-06
55038	CDCA4	-0,749965272	0,000381703
113130	CDCA5	-1,390326181	0,000131953
55143	CDCA8	-1,551488532	5,39E-06
983	CDK1	-2,25512795	2,26E-05
1017	CDK2	-1,522310335	6,11E-06
8099	CDK2AP1	-0,842433726	0,007418004
1031	CDKN2C	-1,040720229	0,000834956
1032	CDKN2D	-1,077519903	0,000144147
1033	CDKN3	-0,78163066	0,001227528
1039	CDR2	-0,715385482	0,00276937
81620	CDT1	-1,016263855	5,80E-05
1054	CEBPG	-0,876710004	0,001909738
1058	CENPA	-1,220188162	8,13E-05
1060	CENPC1	-0,599225482	0,028899799
1063	CENPF	-0,729531958	0,002353656
64946	CENPH	-0,80052507	0,011438541
2491	CENPI	-1,18678184	5,39E-06
64105	CENPK	-1,560060422	6,46E-06
91687	CENPL	-1,19969589	2,31E-05
79019	CENPM	-1,089932482	1,65E-05
79172	CENPO	-0,672299405	0,004750552
55166	CENPQ	-1,614682086	4,91E-06
387103	CENPW	-1,007161993	8,13E-05
145508	CEP128	-0,867587993	3,42E-05
22995	CEP152	-0,815447661	0,01067436
55165	CEP55	-0,871430868	0,000156971
285753	CEP57L1	-0,671765708	0,002587219
55722	CEP72	-0,783840896	0,000798701
79959	CEP76	-0,682309898	0,004737963
84131	CEP78	-1,094657973	1,55E-05
494143	CHAC2	-0,990683713	4,55E-05
10036	CHAF1A	-1,491449931	4,91E-06
8208	CHAF1B	-1,243664641	2,31E-05
84303	CHCHD6	-0,671288787	0,000785459
1111	CHEK1	-0,705112144	0,000195088
26973	CHORDC1	-0,619516607	0,016903779
1138	CHRNA5	-0,688179511	0,002635745
1147	CHUK	-0,649566509	0,056237786
57019	CIAPIN1	-0,660304732	0,001928008
26586	CKAP2	-0,690004041	0,001592473
150468	CKAP2L	-1,330197119	9,38E-06
1164	CKS2	-0,904770879	0,001776734
63967	CLSPN	-0,948979882	0,000173103
56942	CMC2	-0,87373366	0,000745501

1278	COL1A2	-0,9220423	0,006465417
1281	COL3A1	-0,888458685	0,001814337
51397	COMMD10	-0,817802228	0,018393315
8533	COPS3	-0,816424256	0,000296966
10987	COPS5	-0,660617067	0,002775392
27235	COQ2	-0,661732218	0,000271895
51805	COQ3	-0,767236936	0,000152132
11151	CORO1A	-1,401678095	4,37E-05
10328	COX4NB	-0,670574965	0,001140242
1434	CSE1L	-0,743053099	0,006389535
1466	CSRP2	-0,813485341	0,000572389
1479	CSTF3	-0,678362662	0,00074003
1491	CTH	-0,619273723	0,009473569
1503	CTPS	-0,858987568	0,010277984
51076	CUTC	-0,760747661	0,000170234
1528	CYB5A	-0,628057678	0,012551712
10926	DBF4	-0,831997093	0,000178516
1622	DBI	-0,967661678	0,001874969
1633	DCK	-0,803465649	0,005403908
64858	DCLRE1B	-0,78136331	5,85E-05
79077	DCTPP1	-0,747454648	0,002503647
1643	DDB2	-0,80463902	0,000159397
54541	DDIT4	-1,390939338	0,004080104
1663	DDX11	-0,595872178	0,028114501
9416	DDX23	-0,619607081	0,006550431
10212	DDX39A	-0,773561959	0,000352258
9879	DDX46	-0,795155254	7,14E-05
54849	DEF8	-0,771924487	0,000761708
7913	DEK	-0,708352434	0,000333554
55635	DEPDC1	-1,208971107	0,001020983
55789	DEPDC1B	-0,818108484	0,000320423
91614	DEPDC7	-0,635210818	0,001296391
1717	DHCR7	-0,743805061	0,000476859
9249	DHRS3	-1,111869564	0,00110423
1665	DHX15	-0,813888344	0,000157901
81624	DIAPH3	-0,670433999	0,004318792
1739	DLG1	-0,649139258	0,001703395
9787	DLGAP5	-1,04891051	2,36E-05
11144	DMC1	-0,693830671	0,003077685
1763	DNA2	-0,969758707	0,000258167
3301	DNAJA1	-0,595735333	0,005055753
51726	DNAJB11	-0,671248029	0,001820328
22826	DNAJC8	-0,706365529	0,001717787
1786	DNMT1	-0,679027238	0,000857847
1789	DNMT3B	-1,132914039	0,00011258
29980	DONSON	-1,281379338	4,50E-06
79075	DSCC1	-1,143607913	2,31E-05
79980	DSN1	-1,190367816	0,000107116
51514	DTL	-2,044043474	5,72E-05
1841	DTYMK	-0,878416054	0,000131953
1852	DUSP9	-0,592276294	0,007746743
144455	E2F7	-0,807068804	0,000970798
79733	E2F8	-2,204358743	2,15E-06
10682	EBP	-0,84342416	0,000245755

1894	ECT2	-1,207213672	1,57E-05
8726	EED	-0,904639273	4,69E-05
9521	EEF1E1	-0,653796634	0,000603611
1964	EIF1AX	-0,63028812	0,007107859
1965	EIF2S1	-0,701599786	0,000476859
1994	ELAVL1	-0,619623138	0,00275319
146956	EME1	-0,635273438	0,000235007
2013	EMP2	-0,890070895	0,000131953
58478	ENOPH1	-0,592325565	0,010651323
54821	ERCC6L	-1,388940927	2,00E-05
157570	ESCO2	-1,205684039	4,31E-05
9700	ESPL1	-1,106213906	6,83E-05
2108	ETFA	-0,610876453	0,006520221
9156	EXO1	-2,3920297	4,77E-06
51010	EXOSC3	-0,781947338	0,001081162
11340	EXOSC8	-1,08482627	0,000118567
5393	EXOSC9	-0,648842206	0,003790954
2146	EZH2	-0,855287681	0,000240223
63901	FAM111A	-1,103170389	0,000384326
374393	FAM111B	-1,094412504	0,003418481
151176	FAM132B	-0,632247498	0,005410724
113115	FAM54A	-1,599276614	1,71E-06
54478	FAM64A	-0,815410286	0,001161417
81610	FAM83D	-1,429759983	9,63E-06
2175	FANCA	-0,791086735	0,002890365
2187	FANCB	-1,186440046	0,000133987
2176	FANCC	-0,687996006	0,000308383
2189	FANCG	-0,858603806	0,000393244
55215	FANCI	-1,007281243	4,38E-05
57697	FANCM	-0,784635277	0,000557224
79072	FASTKD3	-0,594556106	0,00558026
26263	FBXO22	-0,600710868	0,001242599
254170	FBXO33	-0,665900847	0,000698052
26271	FBXO5	-1,85711052	4,38E-05
2222	FDFT1	-0,65669764	0,002104977
2224	FDPS	-0,731985917	0,00038851
2237	FEN1	-1,990889675	4,12E-06
63979	FIGNL1	-1,001547441	0,000137935
55033	FKBP14	-0,599903724	0,001398265
2289	FKBP5	-0,77175087	8,30E-05
79672	FN3KRP	-0,673656617	0,000316344
2305	FOXM1	-1,066696495	0,000842105
55632	G2E3	-0,67126883	0,013009109
2624	GATA2	-0,786829642	0,007516997
2632	GBE1	-0,833057102	0,001658187
8487	GEMIN2	-1,051271276	0,00049172
8836	GGH	-0,772201923	0,002804425
9837	GIN51	-1,819872865	9,36E-05
51659	GIN52	-2,211460762	5,31E-06
64785	GIN53	-1,280019793	1,46E-05
84296	GIN54	-0,735693454	0,000353657
2717	GLA	-0,992015495	6,83E-05
10539	GLRX3	-0,666479	0,002538276
51053	GMNN	-1,616790622	4,77E-06

29926	GMPPA	-0,651898128	0,000514416
54584	GNB1L	-0,704520064	0,008719218
10020	GNE	-0,625441542	0,00431056
2805	GOT1	-0,632457299	0,001766421
29899	GPSM2	-0,621082717	0,002088456
84706	GPT2	-0,937463736	0,011094248
83903	GSG2	-1,167904971	0,000784869
51512	GTSE1	-1,109314639	1,11E-05
3014	H2AFX	-0,821827077	0,001385778
9555	H2AFY	-0,60263158	0,000485225
3015	H2AFZ	-1,119973745	5,23E-05
3033	HADH	-0,859188176	0,000250275
8520	HAT1	-1,456701896	2,21E-05
115106	HAUS1	-0,997082194	0,001197716
54801	HAUS6	-1,014733405	0,000294441
55559	HAUS7	-0,753601284	0,000712378
93323	HAUS8	-1,642017723	8,69E-06
3065	HDAC1	-0,61026315	0,003375267
3070	HELLS	-1,671178336	1,71E-06
26275	HIBCH	-0,605550007	0,027383349
3006	HIST1H1C	-0,730012868	0,013354575
8332	HIST1H2AL	-1,07425402	0,001118352
8358	HIST1H3B	-0,975563385	0,000429323
8364	HIST1H4C	-1,042770502	3,72E-05
8360	HIST1H4D	-0,709063376	0,005284676
8367	HIST1H4E	-0,622539612	0,011261222
55355	HJURP	-0,899118381	6,83E-05
6596	HLTF	-0,637784873	0,001436321
3146	HMGB1	-0,68955483	0,000173103
3148	HMGB2	-0,665167308	0,029594746
3161	HMMR	-0,741353962	0,001268019
51155	HN1	-1,105357859	1,30E-05
10949	HNRNPA0	-0,607895709	0,002172474
220988	HNRNPA3	-0,644321103	0,000465707
3182	HNRNPAB	-0,805823268	0,00033948
3183	HNRNPC	-0,940554742	0,000265391
343069	HNRNPCL1	-0,623623527	0,004460199
3184	HNRNPD	-0,6350348	0,003556122
3185	HNRNPF	-0,611105867	0,010102929
3189	HNRNPH3	-0,662988837	0,002213064
10236	HNRNPR	-0,6974126	0,000515096
84343	HPS3	-0,727603336	0,000904138
3295	HSD17B4	-0,592971015	0,016241879
8630	HSD17B6	-1,074321176	0,001006064
84263	HSDL2	-0,607577186	0,001776734
51182	HSPA14	-1,439967206	4,72E-05
3306	HSPA2	-1,305115008	0,000207204
22824	HSPA4L	-0,64089794	0,002421781
3309	HSPA5	-0,608383398	0,00093052
51668	HSPB11	-0,713124143	0,013863105
219844	HYLS1	-1,094538441	1,79E-05
3397	ID1	-1,653543934	1,47E-05
3398	ID2	-2,489939804	5,23E-05
3399	ID3	-2,016387705	5,87E-06

3417	IDH1	-1,017274089	0,00136324
3418	IDH2	-0,736624129	0,00130289
3422	IDI1	-0,964773452	8,13E-05
10437	IFI30	-0,697453147	0,070550025
91353	IGLL3P	-0,606092961	0,079697216
55540	IL17RB	-0,841003474	0,000250275
3608	ILF2	-0,653577877	0,00596738
196294	IMMP1L	-0,884749071	0,003077685
83729	INHBE	-1,162056642	0,005892494
3638	INSIG1	-1,113088866	0,000128305
55756	INTS9	-0,669587547	0,000240474
23421	ITGB3BP	-1,264867185	2,30E-05
3706	ITPKA	-0,759110231	0,001436321
122953	JDP2	-0,591211309	0,001458961
79070	KDELC1	-0,730766185	0,004455134
9768	KIAA0101	-0,979147951	3,48E-05
9692	KIAA0391	-0,613543577	0,002035187
57650	KIAA1524	-0,848308242	0,000157241
3832	KIF11	-1,13008493	1,20E-05
9928	KIF14	-0,716415216	0,002106642
56992	KIF15	-1,077503832	0,000290842
81930	KIF18A	-0,820724469	0,010170868
10112	KIF20A	-1,003061412	0,001550052
9585	KIF20B	-0,62482078	0,036796973
3835	KIF22	-0,77064126	6,35E-05
9493	KIF23	-1,261109399	3,37E-05
11004	KIF2C	-1,134773966	2,30E-05
24137	KIF4A	-0,753767123	0,000748329
3833	KIFC1	-1,542367926	1,85E-05
3812	KIR3DL2	-0,642780009	0,036178409
3839	KPNA3	-0,696599853	0,001436321
144501	KRT80	-1,258969248	0,002022637
3930	LBR	-0,686657214	0,020585488
3978	LIG1	-0,891923161	0,000131477
286826	LIN9	-0,923082827	1,55E-05
9388	LIPG	-0,747675929	0,048839113
4001	LMNB1	-1,345001875	0,00046218
84823	LMNB2	-0,992926841	0,000105821
10162	LPCAT3	-0,596992524	0,006102831
122769	LRR1	-1,455480827	2,15E-06
55379	LRRC59	-0,724236478	0,013276302
57819	LSM2	-0,796972431	0,001230453
25804	LSM4	-0,741294799	0,000546177
84316	LSMD1	-0,617420543	0,001024816
55646	LYAR	-0,790889957	0,00211618
4085	MAD2L1	-1,369287895	0,000112268
55110	MAGOHB	-0,608930441	0,006400049
7873	MANF	-0,702675764	0,000143309
55700	MAP7D1	-0,635044491	0,000254931
4141	MARS	-0,988516809	0,000311472
84930	MASTL	-1,734784827	1,79E-05
55388	MCM10	-2,324420114	0,000106503
4171	MCM2	-1,303311806	3,40E-05
4172	MCM3	-1,676538038	2,85E-05

4173	MCM4	-1,4915538	4,12E-06
4174	MCM5	-1,595634733	0,000258279
4175	MCM6	-1,021744954	3,20E-05
4176	MCM7	-1,223788895	6,83E-05
84515	MCM8	-0,710830501	0,000465707
79892	MCMBP	-0,728567153	0,00051709
9412	MED21	-0,740284592	0,004861326
90390	MED30	-0,603242823	0,033373113
9833	MELK	-1,262196847	1,14E-05
56339	METTL3	-0,804801442	0,000211746
25840	METTL7A	-0,831790708	0,003180392
4257	MGST1	-0,792749113	0,006797954
4277	MICB	-1,288951508	9,88E-06
79003	MIS12	-0,64734259	0,025759891
54069	MIS18A	-0,957031151	2,45E-05
129531	MITD1	-0,718944198	0,015266545
4288	MKI67	-0,847183831	0,001275912
79682	MLF1IP	-0,80925201	9,02E-05
10962	MLLT11	-1,431605738	0,002362714
84057	MND1	-1,588447231	5,39E-05
84300	MNF1	-0,645938177	0,001544694
9526	MPDU1	-0,796125738	0,002592447
10200	MPHOSPH6	-0,637997298	0,000529087
54948	MRPL16	-0,678693392	0,007116138
29074	MRPL18	-0,733108495	0,010851803
10573	MRPL28	-0,636442004	0,003680958
51318	MRPL35	-0,635939916	0,000757116
26589	MRPL46	-0,597991259	0,00081825
51154	MRTO4	-0,592279806	0,011956504
4436	MSH2	-0,795413361	0,002552727
2956	MSH6	-1,087557126	0,00041927
9219	MTA2	-0,637891087	0,003893621
23788	MTCH2	-0,684134653	0,001024816
10797	MTHFD2	-1,253847445	0,00582819
4605	MYBL2	-0,954766948	3,20E-05
80155	NAA15	-0,683026854	0,001049498
80218	NAA50	-0,675135312	0,006116874
4676	NAP1L4	-0,755901379	0,003562435
26502	NARF	-0,646550644	0,000372762
4678	NASP	-1,013837582	6,62E-05
9918	NCAPD2	-0,681159112	0,000641162
23310	NCAPD3	-0,96070661	3,99E-05
64151	NCAPG	-1,025742651	3,31E-05
54892	NCAPG2	-1,40461138	4,36E-06
23397	NCAPH	-1,625007687	1,71E-06
10403	NDC80	-1,027736956	0,000150405
4704	NDUFA9	-0,598986254	0,022112575
55247	NEIL3	-1,384819054	4,33E-06
4751	NEK2	-0,83727809	0,002607741
54492	NEURL1B	-0,963075295	9,90E-05
60491	NIF3L1	-0,608436977	0,000423534
4833	NME4	-0,731247245	0,003327507
25926	NOL11	-0,625651515	0,001520529
11270	NRM	-0,676122002	0,003201383

54780	NSMCE4A	-0,730102938	0,004460199
64943	NT5DC2	-0,738572514	0,000336843
10726	NUDC	-0,716072707	0,000313127
4521	NUDT1	-1,049848272	0,000211746
55270	NUDT15	-0,740722356	0,001019032
11164	NUDT5	-0,841032084	0,000384529
83540	NUF2	-0,906808622	0,000245089
57122	NUP107	-0,811649857	0,000659
23165	NUP205	-0,743773156	0,000172555
129401	NUP35	-1,006731235	3,08E-05
23636	NUP62	-0,840860433	5,20E-05
79902	NUP85	-0,970007401	8,76E-05
9688	NUP93	-0,590131489	0,002488291
51203	NUSAP1	-1,158827596	2,35E-05
29107	NXT1	-0,641570455	0,002034119
11339	OIP5	-1,448014377	2,03E-05
4998	ORC1	-1,909264582	2,46E-05
23594	ORC6	-1,510439762	4,12E-06
92106	OXNAD1	-0,644361301	0,000372852
5033	P4HA1	-0,700615274	0,001601697
5036	PA2G4	-0,888180404	0,003585242
10606	PAICS	-0,758561714	0,00051709
10038	PARP2	-1,064852164	2,04E-05
55010	PARBP	-1,099070657	4,67E-05
23178	PASK	-0,96175613	0,000131953
5080	PAX6	-0,665298937	0,009773168
55872	PBK	-1,573623272	4,77E-06
5111	PCNA	-1,818383273	1,71E-06
5082	PDCL	-0,787196357	0,013871152
5147	PDE6D	-0,652198064	0,077323793
23590	PDSS1	-0,927556022	0,000449186
57107	PDSS2	-0,697697021	0,001161417
57026	PDXP	-0,688143819	0,000818505
5226	PGD	-0,699952334	0,003608326
283871	PGP	-0,592425916	0,001509219
26147	PHF19	-0,742543481	0,000137609
26227	PHGDH	-0,939144279	3,63E-05
5277	PIGA	-0,767434555	0,001325129
8503	PIK3R3	-1,043605106	0,000118567
30849	PIK3R4	-0,628834483	0,001879303
11040	PIM2	-0,60932787	0,002148721
8544	PIR	-0,669320408	0,000645718
9088	PKMYT1	-0,975126211	1,96E-05
51316	PLAC8	-0,805560798	0,046518785
51196	PLCE1	-0,666012489	0,013374274
55344	PLCXD1	-0,801451185	5,23E-05
10733	PLK4	-0,595177048	0,001081162
5357	PLS1	-0,858801086	0,000110839
5358	PLS3	-0,62361638	0,001084818
5359	PLSCR1	-0,677268871	0,013957169
5411	PNN	-0,752198346	0,003348207
56902	PNO1	-0,64752981	0,004837879
25886	POC1A	-0,830189556	0,000659
5422	POLA1	-0,696280539	0,005403908

23649	POLA2	-1,749991483	7,95E-05
5424	POLD1	-0,694021869	0,000245755
10714	POLD3	-1,247523755	0,000310313
5427	POLE2	-1,993850361	4,12E-06
54107	POLE3	-0,638846621	0,02967876
10721	POLQ	-0,991841911	0,000714953
10622	POLR3G	-0,59013292	0,061541339
51728	POLR3K	-1,213753857	6,26E-05
10248	POP7	-0,630286934	0,007660417
8611	PPAP2A	-0,597971049	0,001564911
10105	PPIF	-0,677793675	0,006534852
10465	PPIH	-0,827506882	0,000173053
5496	PPM1G	-0,738301472	0,000636223
5537	PPP6C	-0,640508364	0,000935643
9055	PRC1	-1,187419911	4,78E-05
10935	PRDX3	-0,708739905	0,000661723
5557	PRIM1	-1,293911741	2,30E-05
5558	PRIM2	-0,718967554	0,001800678
145270	PRIMA1	-0,799771443	0,011304873
27339	PRPF19	-0,611153711	0,006401428
84950	PRPF38A	-0,652362528	0,004115425
9128	PRPF4	-0,739362096	0,000319079
5631	PRPS1	-0,922882973	0,000157674
56952	PRTFDC1	-0,670174315	0,004036964
29968	PSAT1	-1,555134904	3,40E-05
5683	PSMA2	-0,808577646	0,000434257
5684	PSMA3	-0,950954403	0,001888329
5687	PSMA6	-0,673860411	0,000588577
5702	PSMC3	-0,758700594	0,003679715
29893	PSMC3IP	-0,811880875	0,000169156
5716	PSMD10	-0,743454906	0,005684461
5717	PSMD11	-0,619608975	0,000589852
10197	PSME3	-0,714404983	0,000917444
8624	PSMG1	-0,841386415	0,000434772
84262	PSMG3	-0,733084475	0,001565253
84722	PSRC1	-1,281270578	4,77E-06
9536	PTGES	-0,934370103	4,31E-05
10728	PTGES3	-0,731704805	0,000938009
51495	PTPLAD1	-0,624986406	0,000365288
9232	PTTG1	-0,877856603	0,000395997
29920	PYCR2	-0,648676819	0,000326317
5861	RAB1A	-0,608718333	0,003420689
5878	RAB5C	-0,606601672	0,004076539
29127	RACGAP1	-1,0285742	0,000408312
5810	RAD1	-0,664355686	0,000348471
5888	RAD51	-1,090045033	5,39E-05
10635	RAD51AP1	-1,914224769	1,71E-06
5889	RAD51C	-1,218814475	2,00E-05
25788	RAD54B	-1,036812458	0,000308383
8438	RAD54L	-1,738953183	1,51E-05
5902	RANBP1	-0,891212916	0,000458477
387496	RASL11A	-0,72041322	0,007660887
5928	RBBP4	-0,70402778	0,000834956
5932	RBBP8	-0,829995558	0,00046479

83759	RBM4B	-0,659029935	0,033050881
1104	RCC1	-0,88159694	0,000141603
55920	RCC2	-0,865187798	0,004395241
5981	RFC1	-0,63314047	0,000372762
5982	RFC2	-1,310609213	5,82E-06
5983	RFC3	-1,230133096	3,33E-05
5984	RFC4	-1,578423477	4,36E-06
5985	RFC5	-1,644828764	1,71E-06
55159	RFWD3	-0,858988139	0,002690079
26150	RIBC2	-1,285459326	2,73E-05
80010	RMI1	-1,242586475	3,37E-05
116028	RMI2	-0,8053167	0,000948323
10535	RNASEH2A	-1,238367741	1,65E-05
6047	RNF4	-0,634754879	0,001161417
6117	RPA1	-0,887580579	4,38E-05
6118	RPA2	-0,832810422	0,000141528
6119	RPA3	-0,617399029	0,030913982
6195	RPS6KA1	-0,860904275	0,000701558
9125	RQCD1	-0,930055982	0,00010472
6240	RRM1	-1,014196704	0,000164581
6241	RRM2	-1,897208488	4,77E-06
88745	RRP36	-0,699074758	0,002095469
84816	RTN4IP1	-0,818801978	0,001340141
25914	RTTN	-0,617101391	0,001221861
8607	RUVBL1	-0,613771185	0,001132171
113174	SAAL1	-0,851024512	0,000308383
10055	SAE1	-0,788022145	0,000125371
8819	SAP30	-0,730732084	0,016174466
163786	SASS6	-1,402646609	2,39E-05
6382	SDC1	-0,714537506	0,013863105
23753	SDF2L1	-1,292196351	0,000159575
6390	SDHB	-0,71929587	0,010811623
9554	SEC22B	-0,602739821	0,008582885
10484	SEC23A	-0,68227909	0,010814118
83642	SELO	-0,749845372	0,001398265
22929	SEPHS1	-0,832627816	6,26E-05
83667	SESN2	-0,697617036	0,001513566
10946	SF3A3	-0,611180552	0,000288769
151246	SGOL2	-1,097995707	7,14E-05
79801	SHCBP1	-1,544333332	3,12E-05
6470	SHMT1	-0,803379573	0,001717787
6472	SHMT2	-0,634773197	0,001065687
23409	SIRT4	-0,77250511	0,003989189
10572	SIVA1	-0,69847299	0,002402864
220134	SKA1	-1,490029603	0,000241522
221150	SKA3	-1,030624356	2,41E-05
6502	SKP2	-1,162639255	0,000245089
7884	SLBP	-0,863386583	0,000305778
6576	SLC25A1	-0,666457069	0,000696397
2030	SLC29A1	-0,726048434	0,00103998
1317	SLC31A1	-0,629526267	0,002690079
6520	SLC3A2	-0,750200923	0,013871152
6539	SLC6A12	-0,665987843	0,032200933
8140	SLC7A5	-0,987630596	0,068101806

10592	SMC2	-0,991438687	1,97E-05
9126	SMC3	-0,592036898	0,062016002
10051	SMC4	-1,005888939	2,45E-05
10285	SMNDC1	-0,763265662	0,001874969
79622	SNRNP25	-0,745823747	0,002030959
9410	SNRNP40	-0,871370268	0,000517378
6632	SNRPD1	-0,635823564	0,002215638
6636	SNRPF	-0,672640757	0,010056898
6648	SOD2	-0,6852207	0,000336843
10615	SPAG5	-1,063161913	6,36E-05
57405	SPC25	-1,681998532	1,71E-06
139886	SPIN4	-0,767868513	0,004297681
63826	SRR	-0,944964843	0,000240223
10250	SRRM1	-0,713086341	0,0028217
6426	SRSF1	-0,685996196	0,000372852
10772	SRSF10	-0,805578757	0,000137609
6427	SRSF2	-0,99139649	0,000183937
6428	SRSF3	-0,72773583	0,000711518
6429	SRSF4	-0,87518413	0,000123192
6432	SRSF7	-0,981248038	1,11E-05
6491	STIL	-1,121826723	3,72E-05
10963	STIP1	-0,714107306	0,001192494
8803	SUCLA2	-0,821242816	0,000706766
6839	SUV39H1	-0,911107692	0,003451335
10492	SYNCRIP	-0,772483784	0,00049221
10460	TACC3	-1,106033792	1,55E-05
9015	TAF1A	-0,740501558	0,001011325
6877	TAF5	-1,292454123	4,77E-06
8407	TAGLN2	-0,717201456	0,000611552
6897	TARS	-0,767872401	0,000637165
51256	TBC1D7	-0,876632157	4,38E-05
6941	TCF19	-1,863909569	2,95E-05
140290	TCP10L	-0,80560527	0,00033948
55775	TDP1	-0,691587295	0,000517378
93081	TEX30	-0,838989736	6,62E-05
7027	TFDP1	-1,040903447	0,000234343
92610	TIFA	-0,939666266	0,008582597
8914	TIMELESS	-0,963123576	0,000123192
54962	TIPIN	-0,959141056	9,02E-05
7083	TK1	-1,540168559	1,16E-05
79073	TMEM109	-0,882555775	0,000111158
51524	TMEM138	-0,678559099	0,000612937
23306	TMEM194A	-0,59991118	0,010577305
7112	TMPO	-1,242640572	1,72E-05
10140	TOB1	-0,668144089	0,00853743
401505	TOMM5	-0,663852626	0,00323342
7153	TOP2A	-0,927782158	0,000772822
11073	TOPBP1	-0,628572493	0,003875506
64222	TOR3A	-0,625679079	0,002544336
51002	TPRKB	-0,705951655	0,001833234
22974	TPX2	-1,360495685	1,65E-05
29896	TRA2A	-0,786379774	0,000270053
10293	TRAIP	-0,762476154	0,000728624
9319	TRIP13	-1,083919756	4,31E-05

60487	TRMT11	-0,743490596	0,018139326
10102	TSFM	-0,594484779	0,001741566
7272	TTK	-1,201069501	1,30E-05
203068	TUBB	-0,763715683	0,003300958
347733	TUBB2B	-0,998531245	0,002189913
51174	TUBD1	-0,625041848	0,013196292
7283	TUBG1	-0,844105919	3,49E-05
27229	TUBGCP4	-0,807829954	0,000141651
7298	TYMS	-1,566400217	5,31E-06
11065	UBE2C	-1,00217682	0,001606499
9040	UBE2M	-0,737281369	0,00403557
7334	UBE2N	-0,782658148	0,001166107
29089	UBE2T	-1,526860579	2,31E-05
55148	UBR7	-1,045381887	3,00E-05
51377	UCHL5	-0,665205116	0,000372852
7360	UGP2	-0,644895565	0,006401428
7374	UNG	-0,746411467	0,000112268
7398	USP1	-1,072841984	2,30E-05
10713	USP39	-0,789490177	0,000245755
51118	UTP11L	-0,619656058	0,000637528
7411	VBP1	-0,706760565	0,000609742
7436	VLDLR	-0,947080834	0,000234269
11311	VPS45	-0,712373444	0,004762895
7443	VRK1	-1,218100717	7,43E-06
7453	WARS	-1,082931999	0,000133493
11169	WDHD1	-1,185708601	5,22E-05
79446	WDR25	-0,592300056	0,056854377
79968	WDR76	-1,378489263	1,00E-05
55135	WRAP53	-0,966470426	3,64E-05
91419	XRCC6BP1	-1,415012005	4,72E-05
8565	YARS	-0,919004476	0,001304255
7533	YWHAH	-0,647568446	0,00159424
150244	ZDHHC8P1	-0,882824606	0,003141014
195828	ZNF367	-2,127520229	0,001192494
118738	ZNF488	-0,928008636	0,003650386
55055	ZWILCH	-1,173498283	0,000298258
11130	ZWINT	-1,649855992	1,85E-06

Translational consequences of 4E-BP1 loss in pancreatic cancer

Pancreatic cancer is among the deadliest malignancies and remains incurable. The lack of efficient therapy highlights the peculiarity of this cancer and the need for new targets to be identified.

Mutations that are characteristic of pancreatic cancer lead to a strong activation of several cellular pathways which all converge on protein synthesis, or translation. This process is tightly regulated in healthy cells but becomes altered in cancer cells, toward an increased translation rate. Pancreatic cancer exhibits a loss of the translational repressor 4E-BP1, which happens early during cancer development and seems specific of this malignancy.

This study demonstrates that 4E-BP1 loss happens in favor of pancreatic cancer cells by promoting their proliferative capacities. Translation is no more regulated and proteins responsible for proliferation are continuously synthesized. This suggests that 4E-BP1 loss may serve as a chemoresistance mechanism, allowing cancer cells to maintain an active proliferation. Targeting translation by mimicking 4E-BP1 function might become an innovative therapeutic approach in order to potentiate chemotherapy.

Conséquences traductionnelles de la perte de 4E-BP1 dans l'adénocarcinome pancréatique

Directeurs de thèse : Dr. Stéphane Pyronnet et Dr. Yvan Martineau

Thèse soutenue le 30 septembre 2016 à l'Institut Universitaire du Cancer de Toulouse

Le cancer du pancréas figure parmi les plus meurtriers et demeure incurable. L'absence de thérapie curative souligne la particularité de ce cancer et le besoin d'identifier de nouveaux mécanismes responsables de ce pronostic sombre.

Les mutations caractéristiques du cancer du pancréas entraînent une forte activation de nombreuses voies cellulaires dont le point de convergence est la synthèse des protéines, ou traduction. Ce processus est finement régulé dans les cellules saines mais se trouve altéré dans les cellules cancéreuses, en faveur d'une augmentation de la synthèse protéique. Dans le cancer du pancréas, la perte d'expression du répresseur de la traduction 4E-BP1 intervient de manière précoce au cours de l'oncogenèse et n'est retrouvée dans aucun autre cancer.

Cette étude démontre que la perte de 4E-BP1 joue en faveur de la cellule cancéreuse pancréatique en lui permettant d'augmenter sa capacité proliférative. En effet, en l'absence de 4E-BP1, la traduction n'est plus régulée et les effecteurs responsables de la prolifération sont continuellement synthétisés. Ceci suggère que la perte de 4E-BP1 pourrait être un facteur de résistance à la chimiothérapie, en permettant aux cellules cancéreuses de maintenir leur prolifération active. Ainsi, cibler la synthèse des protéines en mimant le rôle de 4E-BP1 pourrait constituer une nouvelle approche thérapeutique visant à potentialiser la chimiothérapie.

Mots clés : 4E-BP1, traduction, traductome, cancer du pancréas

Discipline : Cancérologie

Unité de recherche : INSERM 1037, Centre de Recherche en Cancérologie de Toulouse,
Toulouse, France